

ZUR BESTIMMUNG
VON MIKRORENINAKTIVITÄTEN
IN MENSCHLICHEM GEWEBE

Peter Weber

1972

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. K. Kramer

ZUR BESTIMMUNG VON MIKRORENINAKTIVITÄTEN IN MENSCHLICHEM GEWEBE.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Weber

aus

Bistritz/Siebenbürgen

1972



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. H. Dahlheim

Mitberichterstatte: Professor Dr. K. Thureau

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	4
I <u>Die historische Entwicklung des Renin-Angiotensin-Systems</u>	6
II <u>Allgemeine Methoden für die Reninaktivitätsbestimmung</u>	9
1) Die direkte Reninbestimmung	9
a) Über den arteriellen Druckanstieg von Hund oder Ratte	9
b) Immunologischer Nachweis	9
2) Die indirekte Reninbestimmung (über die Angiotensinbildung)	9
a) Angiotensin-Radioimmunoassay	10
b) Chemische Reninbestimmung mit Hilfe synthetischer Substrate	10
c) Angiotensin-Rattentest	11
III <u>Präparative Anreicherung natürlicher Angiotensinogene</u>	12
1) Menschliches Angiotensinogen	12
a) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung	14
b) Sephadex-Gel-Filtration am Gel G-75	16
c) Präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese	19
d) Reinheitskriterien des angereicherten Reninsubstrates	21
2) Anreicherungsverhalten verschiedener natürlicher Angiotensinogene	22
IV <u>Vergleich der Angiotensinbildung mit menschlichem Renin und Reninsubstraten fünf verschiedener Spezies</u>	24
1) Methodik der enzymkinetischen Untersuchungen	24
a) Die Reaktionssysteme	24
b) Der Angiotensin-Rattentest	25
c) Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit	27
2) pH-Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit	29
3) Temperaturabhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit	30

	Seite
4) Angiotensinbildung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationsgemisches	31
a) Das System: Schweinerenin und homologes Substrat	31
α) Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von dem Elektrolytgehalt des Inkubationsgemisches	31
β) Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von dem Harnstoffgehalt des Inkubationsgemisches	34
b) Das System: Menschliches Renin und homologes Substrat	35
α) Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der NaCl-Konzentration des Inkubationsgemisches bei verschiedenen Reninsubstratgehalten	35
β) Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der Phosphatpufferkonzentration des Inkubationsgemisches bei hohen Reninsubstratgehalten	36
5) Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m und Maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} der Systeme: Menschliches Renin - fünf angereicherte Angiotensinogene	37
<u>V Identifizierung und Differenzierung der gebildeten Angiotensine</u>	41
1) Papierchromatographie	41
2) Chymotrypsin-Behandlung	41
3) Reaktionskinetische Erfassung des enzymatischen Angiotensin-Abbaues durch menschliche Erythrozytenangiotensinase	41
a) pH-Abhängigkeit der menschlichen Erythrozytenangiotensinaseaktivität, gemessen am enzymatischen Abbau des menschlichen Angiotensins	42
b) Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Inaktivierung von Angiotensinen fünf verschiedener Spezies	43
4) Differenzierung eines Angiotensingemisches in Angiotensin-I und -II durch den Ratten- und Aortenstreifentest	44
a) Aortenstreifentest nach Helmer	45
b) Angiotensin-I und -II-Gehalte der aus fünf verschiedenen, angereicherten Reninsubstraten freigesetzten Pressor-substanzen	46

	Seite
VI <u>Über die Bestimmung von Mikroreninaktivitäten im menschlichen Gewebe</u>	48
VII <u>Diskussion</u>	50
VIII <u>Zusammenfassung</u>	60
IX <u>Literaturverzeichnis</u>	62

Einleitung

Eine Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems an der Steuerung des Salz-Wasser-Haushaltes im Organismus, an der Pathogenese des renalen Hochdruckes und an der Ödementstehung bei Herzinsuffizienz oder Lebercirrhose erscheint gesichert (17, 44, 47, 58, 125). Allerdings sind wegen der bisher diagnostisch oder prognostisch nicht sicher zu verwertenden Aktivitätsmessungen von Renin oder Angiotensin im Blut die normalen und pathologischen Steuerungsmechanismen erst teilweise quantitativ zu analysieren (17, 57).

Das Vorkommen der zum Renin-Angiotensin-System gehörenden Substanzen (Renin, Angiotensinogen, converting-enzyme, Angiotensin-I und -II, Angiotensinasen) außerhalb des Plasmas haben in den letzten Jahren Versuche angeregt, diese Einzelkomponenten an den Orten ihrer Entstehung und Wirkung getrennt voneinander zu bestimmen. (2-5, 14, 20, 31, 43, 51, 54, 60, 80, 86, 98, 104, 120). Hiermit wird der Vorstellung Rechnung getragen, daß das Renin bzw. das Angiotensin-II, das als wirksame Komponente des Renin-Angiotensin-Systems gilt, gebildet, wirksam und inaktiviert werden kann, ohne quantitativ im zirkulierenden Blut zu erscheinen (111).

Die Tatsache, daß Renin in höheren Konzentrationen in der Lymphe (der Niere, des Ductus thoracicus) als im Blut vorkommt (34, 80), legt den Schluß nahe, daß das Renin-Angiotensin-System seine Wirkung auch außerhalb des Blutgefäßsystems entfaltet. Hiervon ausgehend, scheint es nützlich, das Renin und die anderen zum Renin-Angiotensin-System gehörenden Substanzen direkt im Gewebe zu bestimmen.

Verschiedentlich konnte gezeigt werden, daß die vielfach verwendete Methode, den Reningehalt in der Niere durch Ermittlung des Granulationsindex der juxtaglomerulären Apparate zu ermitteln, nicht mit den auf chemischem Wege bestimmten Reninaktivitäten übereinstimmt. Möglicherweise enthalten die in den juxtaglomerulären Zellen vorhandenen Granula neben dem Renin auch noch andere biologisch wirksame Substanzen, so daß der Granulationsindex

kein sicheres Maß für die Reninaktivität im Gewebe ist. Auch die chemisch bestimmte Reninaktivität in den juxtaglomerulären Zellen braucht durchaus nicht mit der peripher nachgewiesenen Plasma-reninaktivität zu korrelieren.

Die indirekte Messung der Reninaktivität im Gewebe über die enzymatische Angiotensinfreisetzung erfordert die Herstellung eines geeigneten, angereicherten Reninsubstrates, da der Angiotensin-gehalt des Gewebes für eine ausreichende Angiotensinbildungs-geschwindigkeit zu niedrig ist (23, 51, 111). Dieses homologe oder heterologe Reninsubstrat sollte eine kleine Michaelis-Menten-Konstante und eine hohe Reaktionskonstante mit dem menschlichen Renin haben und muß frei von störend einwirkenden Komponenten sein. Die in vitro gemessene, als Maß für die Reninaktivität zu wertende Angiotensinfreisetzung sollte bei den optimalen Reaktionsbedingungen erfolgen (pH, Temperatur, Ionenmilieu). Für die Renin-aktivitätsbestimmung ist ferner die Geschwindigkeit der enzymatischen Inaktivierung des gebildeten Angiotensins durch Angioten-sinasen von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit sollen die oben genannten, optimalen Reaktionsbedingungen für die quantitative Bestimmung von Mikro-reninaktivitäten über die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in menschlichem Gewebe untersucht werden.

I Die historische Entwicklung des Renin-Angiotensin-Systems

Das Renin wurde 1898 von Tigerstedt und Bergmann als blutdrucksteigernde Substanz beschrieben (126). Aber erst etwa 30 Jahre danach, 1934, als Goldblatt gefunden hatte, daß durch einseitige Nieren-Arterien-Abklemmung bei Hunden ein Hochdruck erzeugt wird, begann die intensive Erforschung des Renin-Angiotensin-Systems (50). 1939 beschrieben Page und Helmer und gleichzeitig Braun-Menendez et al., daß durch das Renin eine vasoaktive Substanz von einem im Blutplasma enthaltenen Proteinkörper enzymatisch abgespalten wird, und darauf die vasokonstriktorische Wirkung des Renins beruht (12, 92, 93). 1947 zeigte Goldblatt, daß der von ihm schon 1934 erkannten Blutdrucksteigerung nach Nieren-Arterien-Abklemmung ein hormoneller Mechanismus zu Grunde liegt (47).

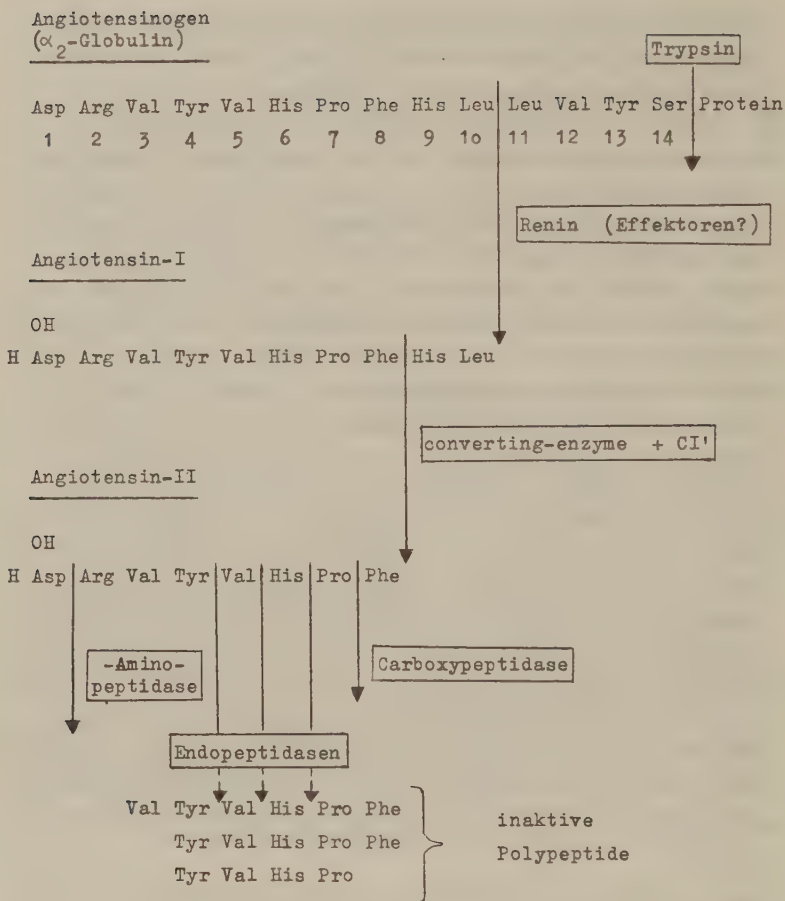
Diese Erkenntnisse führten zu einer langen, bis heute nicht beendeten Diskussion über die Rolle des Renin-Angiotensin-Systems für die Pathogenese verschiedener Hochdruckformen beim Menschen. Während dieser Zeit wurde eine Anzahl von Fakten erarbeitet, die dem heutigen Verständnis des Renin-Angiotensin-Systems ihre Prägung gegeben haben. So wird heute die Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems an der Regulation des arteriellen Blutdruckes (13, 45, 58, 77, 100, 117, 127) sowie des Natrium-Haushaltes (Beeinflussung von Glomerulum-Filtrat, Nieren-Tubulus-Funktion und Aldosteron-Sekretion) (6, 40, 42, 72, 82, 83, 87, 121-125, 128), an der Regulation des extracellulären Volumens (41, 44, 70, 129, 130) und an der Erhöhung des Sympathikus-Tonus (57) diskutiert.

1945 erkannte Goormaghtigh, daß das Renin vornehmlich in den juxtaglomerulären Apparaten der Niere lokalisiert ist (53). In der Folge wurde das von verschiedenen Untersuchern bestätigt (20, 21, 9, 39, 67). Johnson und Wakerlin sowie Goldblatt, Haas und Lamfrom untersuchten die antigenen Eigenschaften der Renine verschiedener Spezies und zeigten u.a., daß ein "Goldblatt-Hochdruck" bei Hunden durch ein Anti-Renin beseitigt werden kann (48, 74). 1943 zeigten Plentl, Page und Davis, daß das Reninsubstrat (Angiotensinogen) ein Protein der α_2 -Globulin-Fraktion des Plasmas ist (98). 1954 veröffentlichten Green und Bumpus

eine Methode, nach der das Reninsubstrat durch partielle Säure-denaturierung und anschließende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung angereichert werden kann (54). Skeggs et al. erhielten 1957 nach Trypsin-Behandlung von Pferde-Angiotensinogen ein Tetradeka-peptid, aus welchem nach Renineinwirkung das blutdrucksteigernde Angiotensin freigesetzt wird (110). Die Aminosäuresequenz dieses Tetradeka-peptids wurde aufgeklärt und gezeigt, daß das Renin an der Leucin-Leucin-Bindung dieses Moleküls angreift und ein Dekapeptid, nämlich das Angiotensin-I abspaltet (114). Helmer zeigte 1957 an dem Aortenstreifen des Kaninchens, daß dieses Dekapeptid am isolierten Organ nicht konstriktorisch wirksam ist (68). Erst durch das converting-enzyme, dessen Aktivität im Blut sowie in fast allen Körpergeweben (Lunge, Herz, Leber, Ileum und Niere) vorhanden ist, wird von diesem Dekapeptid das vasokonstriktorisch wirksame Oktapeptid Angiotensin-II abgespalten (85, 86, 90, 109). Das Angiotensin-II konnte 1956 von Skeggs isoliert, und von Lentz et al. dessen biochemische Beziehung zum Angiotensin-I aufgeklärt werden (115, 79). Von Schwyzer et al. sowie Bumpus et al. wurde 1957 das Ileu^5 -Angiotensin-II synthetisiert, das teilweise razemisiert und deshalb biologisch nicht voll wirksam war (103, 108). Arakawa und Bumpus isolierten 1961 die wirksame Form (1). Im gleichen Jahr vermutete Davis, daß ein Hormon die Aldosteronausschüttung beeinflusst (35). Laragh et al. und Biron et al. zeigten unabhängig voneinander, daß Angiotensin-II die Aldosteronsekretion stimuliert (7, 76).

Das in vivo gebildete Angiotensin wird von Peptidasen, die in fast allen Geweben und im Blut (Erythrozyten und Plasma) vorhanden sind, zu inaktiven Polypeptiden abgebaut (57). Welche quantitative, physiologische oder pathophysiologische Rolle dabei den verschiedenen, als Angiotensinasen bezeichneten Enzymen zukommt, ist bis heute noch zum großen Teil ungeklärt (95, 111).

Die biochemische Bildung, die Struktur und den enzymatischen Abbau des physiologisch wirksamen Angiotensin-II zeigt das nachfolgende Schema (57):



II Allgemeine Methoden für die Reninaktivitätsbestimmung

Der quantitative Nachweis von Mikroreninaktivitäten stellt nach wie vor ein großes Problem dar. Prinzipiell lassen sich alle gebräuchlichen Meßmethoden von Mikroreninaktivitäten in zwei Gruppen einteilen: der direkten und indirekten Reninbestimmung.

1) Die direkte Reninbestimmung

Bei der direkten Reninbestimmung wird die reninhaltige Probe entweder direkt einem Testtier injiziert oder das Renin immunchemisch nachgewiesen.

a) Über den arteriellen Druckanstieg von Hund oder Ratte

Früher wurde das Renin durch direkte intravenöse Injektion in Testhunde (49) oder ganglienblockierte (94) bzw. nephrektomier- te Ratten (60) gemessen. Der darauf eintretende Blutdruckanstieg ist im empfindlichen Bereich der Dosiswirkungskurve ein direktes Maß für die injizierte Reninaktivität und beruht auf der Wirkung der durch das Renin vom endogenen Reninsubstrat abgespaltenen Angiotensinmenge. Nachteil dieses Verfahrens ist die relativ geringe Nachweisempfindlichkeit und das Auftreten von Tachyphylaxie nach Gabe von größeren Reninmengen. Diese Art der Renintestung wird heute praktisch nicht mehr verwendet.

b) Immunologischer Nachweis

In den letzten Jahren sind von einer Reihe von Autoren (58, 132, 133) immunchemische Verfahren zur quantitativen Erfassung von Reninaktivitäten entwickelt worden. Diese Methoden beruhen auf der Bildung von Antikörpern durch hochgereinigte Reninpräparate. Mit den gewonnenen Antikörpern lassen sich unbekannte Reninkonzentrationen bestimmen. In Kombination mit einem Hämagglutinationstest oder mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antiserum war es z.B. möglich, Renin in den juxtaglomerulären Apparaten der Niere, im Urin, oder den Reninanstieg im Serum beim experimentell erzeugten, akuten Hochdruck bei Tieren zu bestimmen (61, 39).

2) Die indirekte Reninbestimmung (über die Angiotensinbildung)

Es wurden bislang zahlreiche Methoden über die indirekte Renin-

bestimmung vornehmlich durch Bildung des vasopressorisch wirksamen Angiotensins beschrieben, daneben jedoch auch durch Nachweis einer von einem synthetischen Substrat abgespaltenen, fluoreszierenden β -Naphthyl-amid-Gruppe.

a) Angiotensin-Radioimmunoassay

Die erst in letzter Zeit entwickelte Radioimmunotechnik zur Bestimmung der durch das Renin gebildeten Angiotensinkonzentration ist für Routineuntersuchungen besonders erfolgversprechend. Dabei wird das als Antigen nur sehr schwach wirksame Angiotensin (37, 52) entweder an Proteinträger (36), Poly-L-Lysin (66) oder an feine Holzkohleteilchen (10) komplex gebunden, um seine Antigeneigenschaften zu vergrößern. Die von Page et al. (91), Boyd et al. (11), Hollemans et al. (71), Gocke et al. (46) und Catt et al. (18) in den letzten Jahren angegebenen Methoden zum Nachweis der Reninaktivität über die Messung des Angiotensin-II, konnten in jüngster Zeit von Haber et al. (65) noch dadurch vereinfacht werden, daß eine Immunreaktion gegen Angiotensin-I entwickelt wurde. Hierdurch ist es möglich, unter Ausschluß der converting-enzyme-Aktivität und der Angiotensinasewirkung die direkte Reninaktivität zu erfassen.

b) Chemische Reninbestimmung mit Hilfe synthetischer Substrate

Von Reinhartz et al. (102) wurde ein chemischer Test angegeben, bei dem, wie in den früheren Untersuchungen von Skeggs (112, 113), das synthetische Peptid Z-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser- β -Naphthylamid an der Leucin-Leucin-Bindung durch Renin gespalten wird. Das fluoreszierende β -Naphthylamid wird durch darauffolgende Einwirkung der Aminopeptidase M für die Messung freigegeben. Bislang ist dieser Test jedoch nur für gereinigte Reninpräparationen (empfindlich bis $0,001 \text{ GE}^1$) geeignet. Rohextrakte ergeben durch Beimengungen anderer Peptidasen zu hohe Fluoreszenzwerte, während bei Verwendung von Serum als Reninsubstrat gar keine Fluoreszenz auftritt. Die entstandenen Tetrapeptide werden sofort an Serumproteine gebunden, wodurch ihre weitere Abspaltung bis zur Freisetzung des β -Naphthylamids verhindert wird. Somit eignet sich diese Methode noch nicht für

^{1/} 1 GE = 1 Goldblatteinheit (siehe S. 25)

die Bestimmungen endogener Reninaktivitäten.

c) Biologischer Angiotensintest (Angiotensin-Rattentest)

Ein großer Teil der Reninbestimmungen der letzten Jahre wurde mit Methoden durchgeführt, die alle auf einem ähnlichen Prinzip beruhen: Plasma (8, 61, 69, 97), reninhaltiges Gewebe (14, 27) oder angereichertes Renin (81) wird in vitro inkubiert. Das aus dem im Plasma endogen enthaltenen (9,97) oder aus dem zugesetzten Renin-substrat (heterolog (16, 35, 55, 99, 116), homolog (106) bzw. synthetisch (84, 113)) freigesetzte Angiotensin-I und -II (9, 55, 106) wird biologisch am Blutdruckanstieg von speziell präparierten, narkotisierten Ratten (60, 94) bzw. wachen, trainierten Hunden (49) oder an der Kontraktion isolierter Gefäß- und Darmabschnitte (68, 101) getestet. Dabei kann die Reninaktivität aus der bei definierten Inkubationsbedingungen (pH, Temperatur, Substratsättigung, Ionenstärke (27, 29, 32)) enzymatisch freigesetzten Angiotensinmenge bestimmt werden. Die Eichung erfolgt meistens mit einem reinen, standardisierten, synthetischen Angiotensin-II-Präparat (z.B. Val⁵-Hypertensin-II-Asp-Samid, Ciba).

III Präparative Anreicherung natürlicher Angiotensinogene

Eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Bestimmung von Mikroreninaktivitäten im Gewebe ist die Verwendung eines möglichst reinen Reninsubstrates im Inkubationsansatz (22, 23, 25, 30, 105). Denn im Gegensatz zu den Reninbestimmungen im Serum, wo der endogene Angiotensinogengehalt oft für eine Enzymbestimmung ausreicht (97), kann man dies für das Gewebe mit Sicherheit verneinen (23, 51, 111).

Plentl, Page und Davis (98) fanden das Reninsubstrat in der α_2 -Globulin-Fraktion des Plasmas. Daher sollte das Ziel der Anreicherung eine möglichst weitgehende Isolierung des Angiotensinogens von der quantitativ ins Gewicht fallenden Albumin- und γ -Globulin-Fraktion des Serums sein. Neben der Isolierung des Angiotensinogens von diesen inerten Proteinen, sollten jedoch auch die begleitenden, mit dem Renin-Angiotensin-System interferierenden Enzyme (Renin, Angiotensinasen, converting-enzyme) während der Anreicherung abgetrennt werden. Die Reinheit des Reninsubstrates von den angeführten, störenden Komponenten ist über die Anreicherung des Angiotensinogens hinaus das zweite, für die praktische Verwendbarkeit des Reninsubstrates nicht minder wichtige Ziel (23, 28, 26).

Der Erfolg der Anreicherung, nämlich die Abtrennung der inerten Proteinfraktionen von dem Angiotensinogen, läßt sich an dem im Laufe der Anreicherung ansteigenden spezifischen Reninsubstratgehalt der optimalen Fraktionen ansehen. Dabei wird der spezifische Reninsubstratgehalt bestimmt, indem eine Proteinprobe mit einem Überschuß an Renin inkubiert und das danach gebildete Angiotensin in ng Angiotensin-II-amid (Hypertensin Ciba) gleicher pressorischer Aktivität pro mg Protein ausgedrückt wird (28, 31).

1) Menschliches Angiotensinogen

Grundlage für die nachfolgend beschriebene Anreicherung des menschlichen Angiotensinogens waren die von uns bereits früher durchgeführten systematischen Untersuchungen über das Anreicherungsverhalten des Schweine-Reninsubstrates (31). Dabei hatte sich die Kombination folgender drei Anreicherungsstufen als am günstigsten erwiesen:

a) Fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bei pH 7,5 bzw. NaCl-Fällung bei pH 3,2.

b) Sephadex-Gel-Filtration an dem Gel G-75; hierbei erfolgt die Trennung der Proteine weitgehend nach der Molekülgröße bzw. dem Gewicht der Teilchen. Es kann jedoch auch ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten der verschiedenen Proteine eine Auftrennung bewirken.

c) Präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese nach der Methode von Dr. L. Strauch; hierbei kommen Geleffekt und Elektrophorese zur Auswirkung (119).

Da von anderer Seite (134) vermutet wird, daß aus dem Reninsubstrat durch Pepsin ein vasoaktives Peptid freigesetzt wird, wurde untersucht, ob mit Hilfe dieses Enzyms anstelle des Renins Angiotensinogenkonzentrationen quantitativ gemessen werden können.

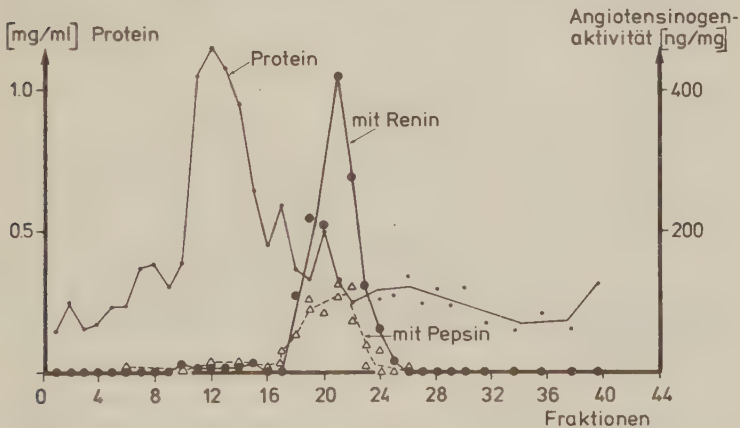


Abb. 1:

Beispiel der Messung der Reninsubstratverteilung nach präparativer Acrylamid-Disk-Elektrophorese mit Reninüberschuß (Punkte) und Pepsin (Dreiecke).

Abzisse: Fraktionsfolge der eluierten Proben

Li. Ordinate: Proteinkonzentration [mg/ml]

Re. Ordinate: Spezifischer Reninsubstratgehalt [ng/mg]

Durch Pepsin wurde aus dem Reninsubstrat eine pressorisch wirksame Aktivität entwickelt, die sowohl am Rattentest, als auch am isolierten Gefäßstreifen wirksam war. Wir konnten zeigen, daß bei der Anreicherung des hier untersuchten, menschlichen Reninsubstrates die Aktivitätsverteilungskurven, die mit Pepsin ermittelt wurden, mit den durch Inkubation mit menschlichem Renin gefundenen Verteilungskurven übereinstimmten (Abb. 1).

Die mit Pepsin (0,1 mg/ml Inkubationslösung) wegen der pH-Empfindlichkeit des menschlichen Angiotensinogens (116) bei pH 4,8 durchgeführten Inkubationen ergaben nur 1/4 der mit Reninüberschuß erreichten Werte (pH-Optimum des Pepsins: 1,8 - 3,8). Jedoch war das Verhältnis der entwickelten pressorischen Aktivitäten in beiden Fällen konstant (1:4). So konnte aus Gründen der Reninersparnis auch Pepsin zur Ermittlung der Reninsubstratverteilungskurven während der drei Anreicherungschritte verwendet werden. Die optimalen Fraktionen wurden dabei zur Ermittlung der absoluten Aktivitätswerte stets mit einem Überschuß an menschlichem Renin nachgetestet.

a) Fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung

Es wurde mit EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz) versetztes Plasma (15 %) als Ausgangssubstanz verwendet. Die Ausgangsvolumina betrugen bei vier Anreicherungsserien 50 - 220 ml. Das auf -18 bis -24°C gefrorene Plasma wurde zunächst bei Zimmertemperatur oder niedriger aufgetaut und das hierbei irreversibel ausfallende Protein in der Spinco-L-2 Ultrazentrifuge unterhalb 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 100 - 300 ml fassendes Plastikgefäß gegeben. Darauf wurde der pH des Plasmas mit 3n HCl- bzw. 3n NaOH-Lösung auf 7,5 eingestellt. Die fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung wurde mit zwei Fällungen zu je 50 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/1$ Ausgangsserum begonnen. Die kontinuierliche Zugabe des Salzes erfolgte in kleinsten Mengen und unter dauerndem Rühren des Plasma-Salz-Gemisches mit einem Magnet-Rührer. Ab 100 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/1$ Ausgangsserum wurde in kleineren Schritten von 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/1$ fraktioniert weitergefällt, bis Salzsättigung der Lösung erzielt war. Bei dem Fällungsvorgang lag die Temperatur

unterhalb 5°C . Die einzelnen Protein-Niederschläge wurden in der Ultra-Zentrifuge bei $4 - 5^{\circ}\text{C}$ abgetrennt und mit aqua dest. quantitativ in vorbereitete Dialysebeutel (Größe ca. $3-4 \text{ cm} \times 10-15 \text{ cm}$) gespült. Die einzelnen, ausgefällten Fraktionen wurden etwa 8 Tage unter ständigem Rühren gegen 4°C kaltes, destilliertes Wasser dialysiert. Dabei wurde das Dialysewasser zweimal täglich gewechselt. Die bei dem Dialysevorgang ausfallenden, inerten, wasserunlöslichen Proteinanteile wurden anschließend vom Überstand getrennt, eingefroren und zur Bestimmung der Proteinausbeute gefriergetrocknet. Die angiotensinogenhaltigen Überstände wurden ebenfalls auf -25°C eingefroren, gefriergetrocknet, gewogen und nach der oben angegebenen Methode auf ihren Angiotensinogengehalt hin untersucht.

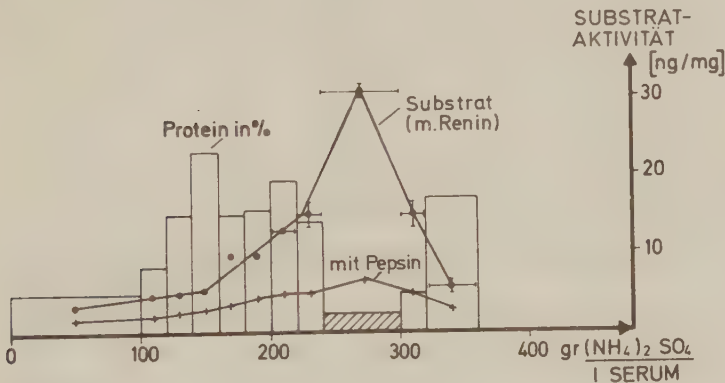


Abb. 2: (106)

Fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bei pH 7,5 zur Gewinnung des Angiotensinogens aus menschlichem Serum.

Abszisse: Zugegebene $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Menge pro 1 Ausgangsserum in g
Flächen der Rechtecke: Ausgefällte Proteinmengen in %

Re. Ordinate: Spezifischer Reninsubstratgehalt in [ng/mg] (26)

Als Beispiel ist das Ergebnis einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung in der Abb.2 dargestellt. Dabei repräsentieren die Rechteckflächen die

jeweils ausgefällten Proteinmengen. Die beiden Kurven zeigen die nach Renin- (oben) bzw. Pepsin-Inkubation (unten) ermittelte Angiotensinogenverteilung an. Die Proteinverteilung zeigt eine Zweigipfeligkeit, mit einem Minimum im Fällungsbereich von 240 - 300 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l Ausgangsserum. In dieser Fraktion findet sich, wie die beiden Verteilungskurven zeigen, der höchste Substratgehalt. Dieses Verhalten war charakteristisch für alle durchgeführten Fällungen.

Die folgende Tabelle 1 zeigt die Einzelwerte der vier Fällungsreihen und die sich daraus ergebenden Mittelwerte:

Tabelle 1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung

Nr.	Fällungsbereich (gr/l)	Gesamtprotein- ausbeute in %	höchster Substrat- gehalt (inkub.m. Re- nin 0,1 GE/ml)	f (Anreicherungs- faktor)	Substrat- ausbeute in %
1	240-320	99	50 ng/mg	2,5	39
2	220-240	100	24 ng/mg	4,3	10
3	240-300	80	25 ng/mg	5,7	10
4	280-300	92	35 ng/mg	3,5	11
Mittel:	270 ± 30	95,5	33,5 ng/mg	3,4	17,5

$f = \text{Anreicherungsfaktor} = \frac{\text{spez. Substratgehalt n. Anreich. in ng/mg}}{\text{spez. Substratgehalt v. Anreich. in ng/mg}}$

$\text{Substratausbeute} = \frac{\text{Gesamtaktivität d. aufgetrennten Fraktionen}}{\text{Gesamtaktivität d. eingesetzten Ausgangssubst.}}$

$\text{Gesamtproteinausbeute} = \text{insgesamt wiedererhaltene Proteinmenge nach dem Trennvorgang in \% der eingesetzten Menge}$

Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Substrataktivität wurden im Anschluß daran über eine Gel-Filtration an dem Sephadex-Gel G-75 weiter aufgetrennt.

b) Gel-Filtration am Gel G-75 (Sephadex)

Systematische Arbeiten zur Anreicherung des Schweineangiotensinogens hatten gezeigt, daß das Sephadex-Gel G-75 für die Renin-substratanreicherung sowohl nach NaCl-Fällung bei pH 3,2, als auch nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bei pH 7,5 und auch ausgehend vom

Serum sehr günstig anzuwenden ist. Dies gilt für die große Trennleistung ebenso wie für die schonenden Trennbedingungen (31, 135). Aufgrund dieser Erkenntnisse und wegen der bei dieser einfachen Anreicherungsmethode möglichen Schonung des empfindlichen menschlichen Reninsubstrates (30, 105, 106, 116) wurde der fraktionierten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Aussalzung die Gelfiltration an dem Sephadex-Gel G-75 nachgeschaltet.

Als Trennsäulen wurden Original-Sephadex-Chromatographieröhre der Größen K 50/100 bzw. K 25/100, jeweils mit Kühlmantel verwendet, die in einer $+3 - +6^\circ\text{C}$ klimatisierten Kühlkammer senkrecht installiert waren. Auf die kleine Säule (K 25/100) wurden 300 mg und auf die große Säule (K 50/100) 500 - 600 mg Protein aufgebracht. Die Konzentration der in 0,9 %-iger NaCl-Lösung gelösten, aufzutrennenden Proteinprobe betrug etwa 35 mg/ml. Der Filtrationsdruck betrug im Mittel 50 cm H_2O , die Durchflußgeschwindigkeit 50 - 60 ml/std. Das Fraktionsvolumen lag bei der kleinen Säule zwischen 6 und 9 ml, bei der großen zwischen 10 und 14 ml. Es wurde ein Radi-Rak-Fraktionssammler der Firma LKB, Bromma 1, Schweden, verwendet, der mittels einer stufenlos verstellbaren Schlauchpumpe mit angeschlossenem Siphon und Kontaktgeber gesteuert wurde. Die Proteinverteilung wurde über die Extinktionen der eluierten Fraktionen mit Hilfe eines Zeiss-Spektralphotometers PMQ 2 ermittelt. Zur Berechnung der Proteinausbeute wurde das mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung eluierte Protein dialysiert, gefriergetrocknet, und der Extinktionskoeffizient bestimmt.

In der Abb. 3 ist das Ergebnis einer Sephadex-Gel-Filtration an dem Gel G-75 dargestellt. Die Proteinverteilungskurve zeigt eine ausgeprägte Zweigipfeligkeit. Über dem aufsteigenden Schenkel des zweiten Proteinmaximums erscheint das Maximum der Angiotensinogenaktivität. Grundsätzlich fand sich dieses Verteilungsmuster bei der Anreicherung von Reninsubstraten verschiedener Spezies an dem Sephadex-Gel G-75.

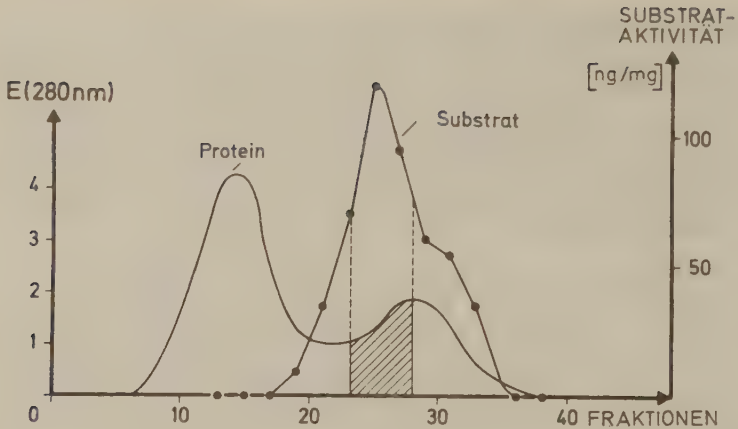


Abb. 3: (106)

Sephadex-Gel-Filtration an dem Gel G-75

Abszisse: Fraktionsfolge der eluierten Proben

Li. Ordinate: Extinktion als Maß für die Proteinkonzentration

Re. Ordinate: Spezifischer Reninsubstratgehalt in [ng/mg]

Die bei der Gel-Filtration an G-75 erhaltenen Einzel- und Mittelwerte sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Sephadex-Gel-Filtration am Gel G-75

	Gesamt- protein- ausbeute	höchster Substrat- gehalt	f	Substrat- ausbeute	Lokalisation
	86,5 %	120 ng/mg	4,5	38,5 %	jeweils knapp
	90,0 %	135 ng/mg	3,0	50,0 %	vor dem zwei-
	78,0 %	90 ng/mg	4,0	40,0 %	ten Protein-
	85,0 %	150 ng/mg	4,2	43,0 %	maximum
Mittel:	84,9 %	124 ng/mg	3,9	42,5 %	

f = Anreicherungsfaktor (siehe S. 16)

Im Anschluß an die Sephadex-Gel-Filtration wurden die Fraktionen mit dem höchsten Angiotensinogengehalt gesammelt und nach Dialyse gegen kaltes, destilliertes Wasser sowie Gefriertrocknung einem dritten Anreicherungsverfahren zugeführt.

c) Präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese

Verwendet wurde die von Dr. L. Strauch (Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München) nach dem Prinzip von Ornstein und Davis (88, 89) entwickelte Apparatur (119) (siehe Abb. 4). Diese enthält ein 2,5 cm weites und 15 cm langes Trennrohr (TR), das zur Abführung der bei der Elektrophorese entstehenden Wärme gekühlt wird. Durch die an beiden Enden der Trennsäule angeordneten Elektroden (E) wird ein elektrisches Feld der Stromdichte $30 - 40 \text{ mA/cm}^2$ und der Spannung von $150 - 170 \text{ Volt}$ so angelegt, daß das aufzutrennende Proteingemisch bei dem gewählten Puffersystem nach Ornstein und Davis ($\text{pH } 8,2$) von oben nach unten

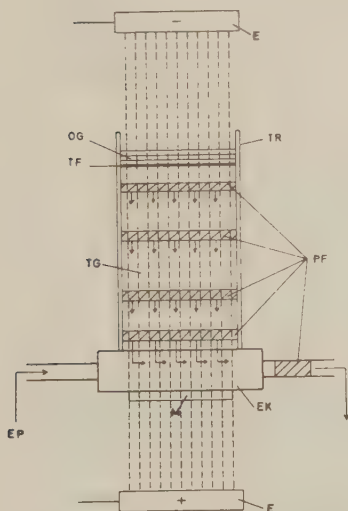


Abb. 4: (119)

Apparatur für die präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese (nach Dr. L. Strauch)

E = Elektroden; OG = Obergel; TF = Trennfläche; TR = Trennrohr; TG = Trenngel (Acrylamid-Gel); PF = Proteinfractionen; EK = Elutionskammer; EP = Elutionspufferlösung; M = halbdurchlässige Membrane

wandert. Zur Konzentrierung der in dem Elektrodenpuffer gelösten Proteinprobe dient eine über dem Trenngel (TG) polymerisierte

Schicht eines weniger vernetzten Obergels (OG). Die Konzentrierung erfolgt scheibenförmig an der Trennfläche (TF) beider Gele. Am unteren Ende der mit dem Trenngel (TG) gefüllten Trennsäule werden die nacheinander in eine flache Elutionskammer (EK) austretenden Proteinfractionen (PF) durch eine quer zur Wanderungsrichtung fließende Elutionspufferlösung (EP) aus dem Trennsystem abgeführt. Durch eine automatisch arbeitende Elutionssteuerung werden die einzelnen Fractionen nach Durchlaufen eines Siphons in Volumina von 2 - 3 ml gesammelt. Die elektronische Elutionssteuerung sorgt durch einen kontinuierlich verlangsamten Elutionspufferfluß dafür, daß die langsamer wandernden Proteinfractionen nicht zu stark verdünnt werden. Die Proteinkonzentration wird mittels einer von dem Elutionspuffer-Proteingemisch durchströmten Mikroküvette in einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei 280 nm gemessen und durch einen Punktschreiber fortlaufend registriert.

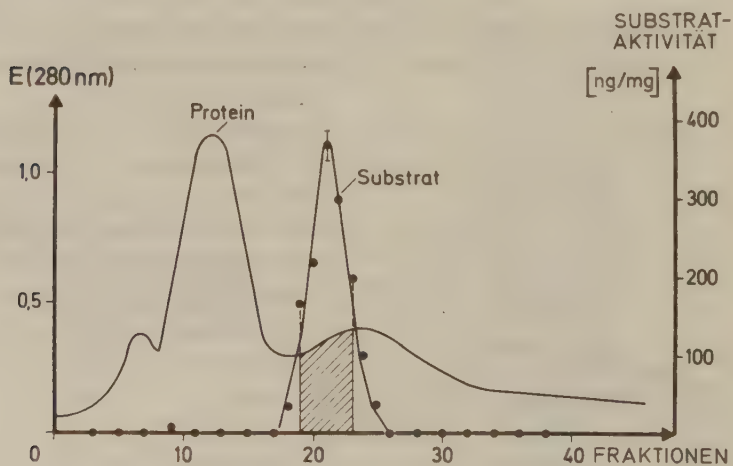


Abb. 5: (106)

Auftrennung durch präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese
Abszisse: Fraktionsfolge der eluierten Proben

Li. Ordinate: Extinktion als Maß für die Proteinkonzentration

Re. Ordinate: Spezifischer Reninsubstratgehalt in $[\text{ng/mg}]$

In der Abb. 5 ist das Ergebnis einer diskelektrophoretischen Auftrennung dargestellt. Das über das Gel G-75 abgetrennte Protein, welches die Reninsubstrataktivität enthält, erscheint in drei Maxima. Die Angiotensinogenaktivität liegt zwischen dem zweiten und dritten Proteingipfel. Durch diese Methode läßt sich der spezifische Reninsubstratgehalt von 120 [ng/mg] auf 400 - 500 [ng/mg] steigern. Das entspricht einem Angiotensinogengehalt von 2,5 %. Der Gesamtanreicherungsfaktor über alle drei Anreicherungsstufen beträgt 50 - 60; die Gesamtaktivitätsausbeute 2,5 - 3 %.

Die bei der präparativen Acrylamid-Disk-Elektrophorese erhaltenen Einzel- und Mittelwerte sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese

	Gesamt-protein-ausbeute	höchster Substrat-gehalt	f	Gesamt-substrat-ausbeute	S _f
1	100 %	350 ng/mg	8	75 %	25 %
2	85 %	300 ng/mg	8	100 %	73 %
3	50 %	380 ng/mg	4	50 %	15 %
4	78 %	500 ng/mg	5	60 %	36 %
5	90 %	400 ng/mg	6	50 %	40 %
Mittel:	80,6 %	384 ng/mg	5,6	67 %	38 %

f = Anreicherungsfaktor (siehe S.16)

S_f = Substratausbeute für die angegebenen Anreicherungsfaktoren f

d) Reinheitskriterien des angereicherten Reninsubstrates

Das durch die vorangehend beschriebenen drei Anreicherungsstufen erhaltene Angiotensinogen ist weitgehend frei von Renin, converting-enzyme und Angiotensinasen.

1.) Aus dem Reninsubstrat entwickelt sich nach 10-stündiger Inkubation ohne Zusatz von Renin keine nachweisbare pressorische Aktivität.

2.) Angiotensinasefreiheit: Proben des Reninsubstrates wurden mit Hypertensin (40 ng/ml) inkubiert. Die Hypertensinkonzentration verminderte sich bei einer Inkubationsdauer von 1 - 2 Std. nicht. Deshalb konnte in den 20 - 30 min. dauernden reaktionskinetischen Bestimmungen der Reninaktivität der Angiotensinasegehalt vernachlässigt werden.

3.) Durch Chymotrypsin ließ sich das gebildete Peptid innerhalb weniger Sekunden inaktivieren.

4.) Der Rf-Wert der aus dem Reninsubstrat gebildeten, vaso-konstriktorisch wirksamen Substanz stimmte mit dem des synthetischen Hypertensin Ciba überein.

5.) Beim reaktionskinetisch ermittelten enzymatischen Abbau mit menschlicher Erythrozytenangiotensinase verhielt sich die gebildete Pressorsubstanz wie ein Angiotensinasesubstrat. Der Logarithmus der jeweils noch vorhandenen Angiotensinkonzentration ist der Inkubationszeit direkt proportional (24, 96).

6.) Am spiralförmig aufgeschnittenen Aortenstreifen des Kaninchens konnte für das aus dem angereicherten Angiotensinogen durch Reninzusatz gebildete Angiotensin keine Aktivität festgestellt werden. Somit kann die Anwesenheit von converting-enzyme nach der dritten Anreicherungsstufe des Reninsubstrates ausgeschlossen werden.

2) Anreicherungsverhalten verschiedener natürlicher Angiotensinogene

Die unter Punkt 1, a-c beschriebenen Methoden zur Anreicherung des menschlichen Angiotensinogens wurden zuvor in analoger Weise zur Gewinnung der Angiotensinogene vier verschiedener Tierespezies angewendet. Die hierbei erhaltenen Mittelwerte für die Gesamtproteinausbeute, die Reninsubstratausbeute, die Anreicherungsfaktoren und die höchsten Reninsubstratgehalte sind für alle fünf angereicherten Angiotensinogene (Schwein, Rind, Ratte, Mensch, Hund) in der nachfolgenden Tabelle 4 vergleichend zusammengestellt (26).

Tabelle 4 : Anreicherungsverhalten der Reninsubstrate fünf verschiedener Spezies über drei Anreicherungsstufen.

Spezies	Anreicherungs-schritte	Gesamtprotein-Ausbeute	Gesamtangiotensinogen-Ausbeute	Anreicherungs-faktor	S _f	Spezifischer Substratgehalt in ng/mg
Schwein	1) NaCl-Fällung, pH 3,2	95 %	2 - 10 %	10 - 30		20 - 35
	2) Sephadex G-75, pH 6,5	89 %	89 %	24	17 %	400 - 600
	3) präp. Acrylamid-Disk-Elektrophorese, pH 8,2	100 %	69 %	2,5 - 3,5	10 - 15 %	1000 - 1200
Mensch	1) (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung, pH 7,5	80 - 100 %	85 %	2,5 - 5,7	10 - 40 %	31
	2) Sephadex G-75 pH 6,5	78 - 90 %	80 %	3 - 5	44 %	90 - 150
	3) präp. Acrylamid-Disk-Elektrophorese, pH 8,2	50 - 100 %	50 - 100 %	4 - 8	15 - 73 %	max. 500
Rind	1) NaCl-Fällung, pH 3,2	100 %	60 %	30 - 35	30 - 40 %	40 - 100
	2) Sephadex G-75, pH 6,5	85 %	100 %	2 - 6	30 %	220
	3) präp. Acrylamid-Disk-Elektrophorese, pH 8,2	68 %	72 %	3 - 4,5	40 - 55 %	ca. 400
Ratte (salzreich ernährt u. nephrekt.)	1) (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung, pH 7,5	100 %		2 - 3	58 %	100
	2) Sephadex G-75, pH 6,5	ca. 100 %	ca. 100 %	3,5	67 %	182
	3) präp. Acrylamid-Disk-Elektrophorese, pH 8,2	93 %	97 %	4 - 6	36 %	1000 - 1500
Hund vorangerei- chertes Substrat	1) entfällt					
	2) Sephadex G-75, pH 6,5	80 - 92 %		3,5 - 4	42 - 57 %	78 - 87
	3) präp. Acrylamid-Disk-Elektrophorese, pH 8,2	ca. 100 %	71 %	2 - 3	40 - 56 %	120 - 130

S_f = Substratausbeute bei den angegebenen Anreicherungs-faktoren

IV Vergleich der Angiotensinbildung mit menschlichem Renin und Reninsubstraten fünf verschiedener Spezies

Bei der Auswahl eines geeigneten Angiotensinogens für die Bestimmung kleiner menschlicher Reninaktivitäten ist nicht nur dessen Anreicherungsverhalten und Reinheit maßgebend, sondern vor allem die Reaktionsgeschwindigkeit der Angiotensinbildung. Diese läßt sich in einem in-vitro-System theoretisch mit Hilfe der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der Reaktionskonstante $\frac{V_{max}}{R}$ über die Michaelis-Menten- Beziehung bestimmen.

Es ist günstig, zur Ermittlung der Konstanten die optimalen Inkubationsbedingungen für die einzelnen Reaktionssysteme (pH-, Temperatur- und Ionenstärkeabhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit) zu kennen.

Es wurden menschliches Angiotensinogen und Reninsubstrate von vier anderen Spezies (Rind, Schwein, Hund und Ratte), die analog angereichert waren, untersucht.

Als Reninpräparate dienten hochangereichertes menschliches Renin (61, 63), das uns freundlicherweise von Dr. E. Haas, Cleveland, Ohio, zur Verfügung gestellt wurde sowie das käufliche, standardisierte Schweinerenin der Firma NBC, Cleveland, Ohio.

Die enzymkinetischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des biologischen Rattentestes durchgeführt.

1) Methodik der enzymkinetischen Untersuchungen

a) Die Reaktionssysteme

0,006 - 0,02 ml einer Reninstammlösung wurden zu den in 0,15 molarem Phosphatpuffer gelösten Reninsubstratansätzen gegeben, so daß sich schließlich ein Inkubationsvolumen von 0,8 ml ergab. Die Reninkonzentrationen der Inkubationsgemische betrugen 0,0046 - 0,0156 [GE/ml]. Die Ausgangskonzentrationen der Reninsubstrate für die Bestimmung der pH-, Temperatur- und Ionenstärkeabhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeiten betrugen: 160 [ng/ml] für das menschliche Reninsubstrat, 170 [ng/ml] für das Rindersubstrat, 180 [ng/ml] für das Hundesubstrat,

220 [ng/ml] für das Schweinesubstrat und 170 [ng/ml] für das Rattensubstrat.

Die Reninsubstratkonzentrationen wurden durch Inkubation mit einem Überschuß an menschlichem Renin (0,11 und 0,26 GE/ml) und daneben auch mit Schweinerenin der Firma NBC, Cleveland, Ohio (0,2 und 0,4 GE/ml) bestimmt. (Temperatur 37°C, Inkubationsdauer 25 min., beim jeweiligen pH-Optimum).

Innerhalb dieser Inkubationszeit wurde das Angiotensinogen vollständig zu Angiotensin umgesetzt. Für das Rinder-, Schweine- und Hundesubstrat wurden mit dem Schweine- und menschlichen Renin übereinstimmende Substratgehalte ermittelt. Beim Rattensubstrat konnte während der Inkubationszeit von 25 min. mit menschlichem Renin nur 1/4 des mit Schweinerenin freigesetzten Angiotensins bestimmt werden. Auch bei ein- und zweistündiger Inkubationsdauer konnte nicht mehr Angiotensinogen umgesetzt werden. Aus menschlichem Reninsubstrat wurde mit Schweinerenin kein Angiotensin freigesetzt, wie bereits von Haas et al. (62) beschrieben wurde.

Die Reninkonzentrationen [R] sind in Goldblatteinheiten definiert (62), wobei eine Goldblatteinheit (GE) die Reninaktivität darstellt, die bei i.v.-Injektion in trainierte, nicht narkotisierte Testhunde einen arteriellen Blutdruckanstieg von 30 mm Hg bewirkt.

b) Angiotensin-Rattentest

Als Testtiere wurden 150 - 250 g schwere, nicht nephrektomierte Albinoratten beiderlei Geschlechts verwendet. Die Narkose wurde mit Inaktin (Na-Salz der 5-Aethyl-5-(1'-methyl-propyl)-2-thio-barbitursäure), Firma Promonta (120 mg/kg Körpergewicht i.p.) bei gleichzeitiger Gabe von Atropin sulfuric. (1,0 mg/kg Körpergewicht s.c.) durchgeführt. Nach Tracheotomie, Katheterisierung der rechten V. jugularis und der rechten Art. carotis unter Schonung der anliegenden Nerven wurde zur Verminderung von Kreislaufreflexen und zur Blutdrucksenkung der Ganglienblocker Anso-lysen (Pentolinium Tartrate), Firma M & B, Dragenham, England, (5 mg/kg Körpergewicht s.c.) verabreicht. Der arterielle Mittel-

druck sank dabei auf 60 - 90 mm Hg ab. Die fortlaufende Registrierung der in der Art. carotis gemessenen Blutdruckschwankungen erfolgte mit Hilfe eines Transducers, Firma Statham, Hato Rey, Puerto Rico, über einen Druckverstärker, Firma Hellige, mit angeschlossenen Direktschreiber, Firma Rikadenki, Kogyo Co., Ltd. (Abb. 6).

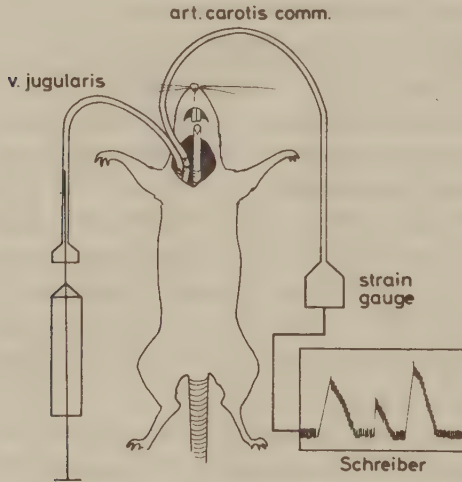


Abb. 6:

Anordnung eines biologischen Rattentestes

Test- und Eichlösungen (Val^5 -Hypertensin-II-Asp- β -amid, Firma Ciba) wurden in Volumina von 0,01 - 0,1 ml in die V. jugularis injiziert. Nach jeder Injektion wurde der Katheder mit 0,1 ml physiologischer NaCl-Lösung gespült. Die Angiotensinempfindlichkeit der Ratte ($\text{tg}\alpha$, siehe Abb. 7) wurde vor und nach jeder reaktionskinetischen oder Endwertbestimmung gemessen. Die Eichdosen für den linearen Empfindlichkeitsbereich lagen zwischen 0,4 und 2,5 ng Hypertensin, Ciba (31).

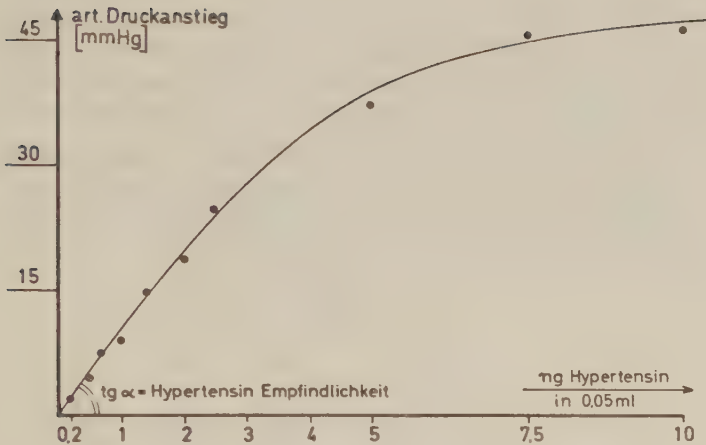


Abb. 7:

Eichkurve für Hypertensin, Ciba, an der narkotisierten Ratte
Abszisse: i.v. injizierte Hypertensinmengen in ng
Li. Ordinate: In der Art. carotis gemessener Blutdruckanstieg

c) Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit dienten jeweils 0,05 ml (in Ausnahmefällen 0,01 - 0,25 ml) des Inkubationsgemisches. Diese wurden mit einer geeichten Mikroliter-spritze, Firma Hamilton, dem Reaktionsansatz entnommen, direkt in die V. jugularis der Ratte injiziert und mit 0,1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung nachgespült. Unter den genannten Bedingungen konnte die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb einer Inkubationszeit von 20 - 30 min. ermittelt werden. Abb. 8 zeigt als Beispiel die reaktionskinetische Messung der Angiotensinbildung aus Schweinesubstrat mit menschlichem Renin. In der oberen Hälfte der Abbildung ist die Originaldruckregistrierung dargestellt. Die Werte ab 18 min. Inkubationsdauer wurden nach Injektion von jeweils 0,025 ml (der Hälfte des vorher gespritzten Volumens) gemessen, da der linear empfindliche Meßbereich des Rattentestes dies erforderlich machte. (siehe Abb. 7).

In dem unteren Teil der Abb. 8 ist links die zeitliche Abhängigkeit der Angiotensinbildung graphisch aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Inkubationszeit und auf der Ordinate die in $[ng/ml]$ gemessene Angiotensinkonzentration abzulesen. Die Reninaktivität wird durch die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit $[ng/min. \cdot ml]$ ausgedrückt und entspricht der Steigung der durch die Meßpunkte festgelegten Regressionsgeraden. Unten rechts ist die Abnahme des Logarithmus der Reninsubstratkonzentration gegen die Inkubationszeit aufgetragen (33).

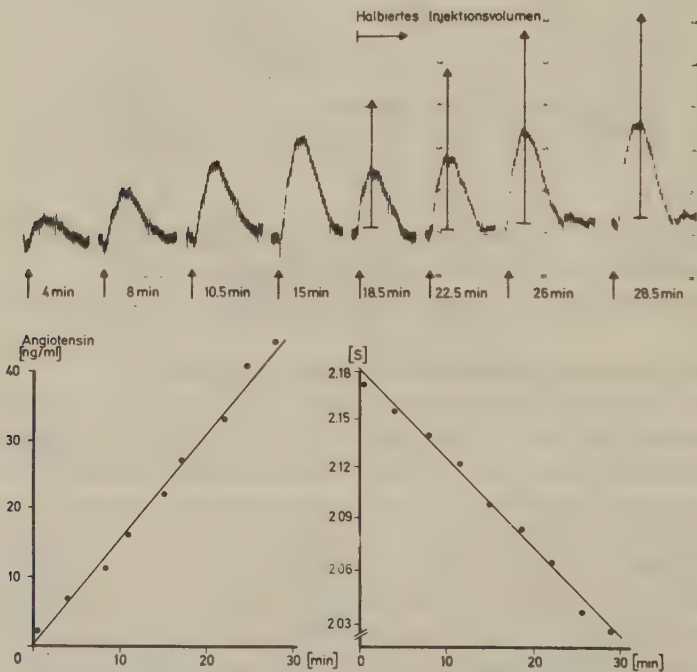


Abb. 8: (33)

Bestimmung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit

Oben: Originaldruckregistrierung

Unten: Zeitlicher Verlauf der Angiotensinbildung

Die verwendeten Reninsubstratkonzentrationen (160 - 220 ng/ml)

lagen für alle Spezies im anfänglichen Bereich der entsprechenden Michaelis-Menten-Kurve. Wegen der geringen Reninaktivität, der hohen Empfindlichkeit des biologischen Tests und der kurzen Inkubationszeiten kann die Reninsubstratkonzentration während der Inkubationsdauer praktisch als konstant angesehen werden (97).

2) pH-Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit

Für fünf Spezies (Mensch, Rind, Schwein, Hund, Ratte) wurde die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit vom pH, wie

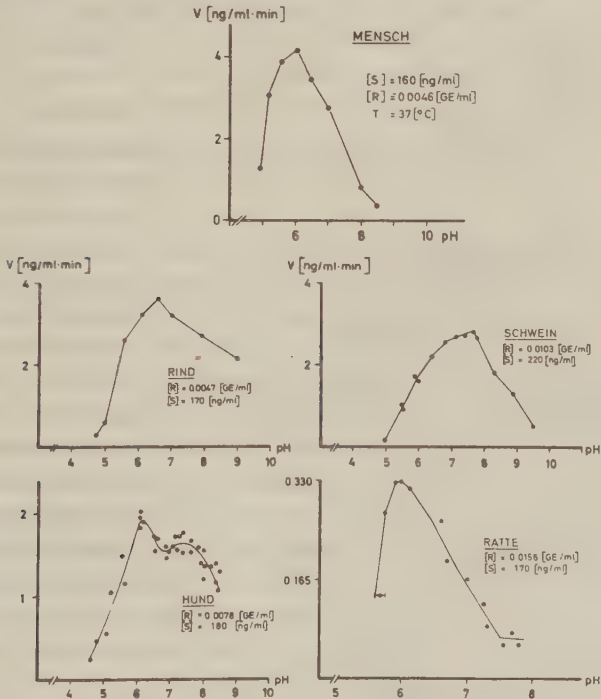


Abb. 9: (33, 106)

pH-Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von Angiotensinogenen fünf verschiedener Spezies mit menschlichem Renin

Abszissen: pH-Werte

Ordinaten: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit $v \text{ [ng/min.} \cdot \text{ml]}$

in Abb. 9 dargestellt ist, ermittelt. Als pH-Optima wurden gemessen: Menschliches Reninsubstrat: 6,0; Rindersubstrat: 6,5; Schweinesubstrat: 7,5; Hundesubstrat: 6,1; Rattensubstrat: 6,0. Jeder der eingezeichneten Punkte wurde reaktionskinetisch ermittelt, siehe a. IV, 1c. Die unterschiedlich großen Reaktionsgeschwindigkeiten erforderten verschiedene Reninkonzentrationen, um optimale Reaktionszeiten zu erreichen.

3) Temperaturabhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v ist in der Abb. 10 für fünf verschiedene Reninsubstrate dargestellt.

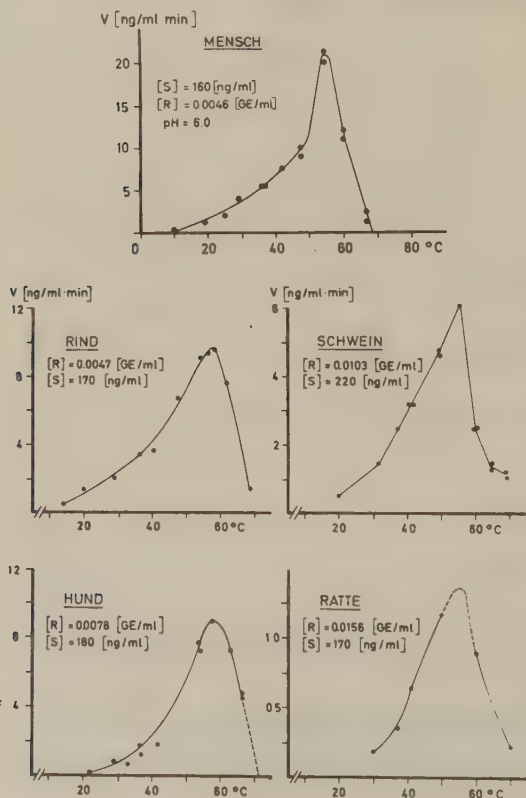


Abb. 10: (33, 106)
Temperaturabhängigkeiten der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von menschlichem Renin mit Angiotensinogenen fünf verschiedener Spezies
Abszissen: Inkubationstemperatur
Ordinaten: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v in $[\text{ng/min.} \cdot \text{ml}]$

Die Temperaturmaxima liegen übereinstimmend zwischen 55 und 58°C. Auch der Kurvenverlauf dieser Abhängigkeiten zeigt für die fünf Spezies ein gleichartiges Verhalten.

4) Angiotensinbildung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationsgemisches

Einige Befunde in der neueren Literatur (8, 17, 27, 78, 84) deuten darauf hin, daß die biologische Reninaktivität in vivo oder auch in vitro von der NaCl-Zufuhr bzw. dem NaCl-Bestand des Organismus beeinflusst wird.

Um herauszufinden, inwieweit die Angiotensinbildung selbst von der Zusammensetzung des Inkubationsgemisches abhängig ist, wurden die nachfolgenden in-vitro-Untersuchungen durchgeführt.

a) Das System: Schweinerenin und homologes Substrat

Zunächst wurden Untersuchungen am Schweinerenin durchgeführt (32).

α) Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von dem Elektrolytgehalt des Inkubationsgemisches

Die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Elektrolytkonzentration des Inkubationsgemisches wurde zunächst für die Alkalisalze NaCl, KCl, NaBr und Na₂SO₄ untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abb. 11 zusammengestellt. Wie aus dieser Darstellung zu ersehen ist, wurde ein gleichartiges Verhalten der Angiotensinbildung bei Veränderung der Ionenstärke der oben genannten Salze beobachtet. Charakteristisch für die Abhängigkeit ist der sehr steile Anstieg der Kurve im Ionenstärkebereich von 0 - 15 mmol, das sich daran anschließende schmale Maximum und der ab etwa 30 mmol hyperbelartig abfallende Kurvenverlauf.

Auch für das CaCl₂ wurde in sonst elektrolytfreier Lösung ein den vorangehend untersuchten Salzen ähnliches Verhalten gefunden (Abb. 12). Die Änderung der CaCl₂-Konzentration in einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung hingegen zeigt keine Wirkung auf die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit.

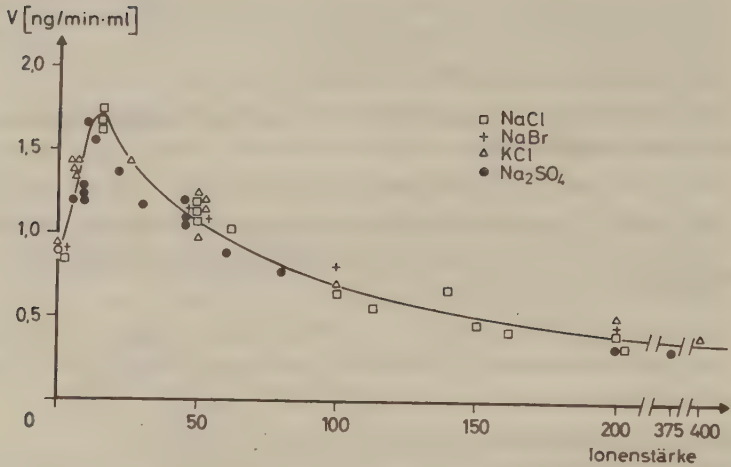


Abb. 11: (32)

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der Ionenstärke verschiedener Elektrolyte

Abszisse: Elektrolytkonzentration des Inkubationsgemisches, ausgedrückt als Ionenstärke

Ordinate: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v [$\text{ng/min} \cdot \text{ml}$]

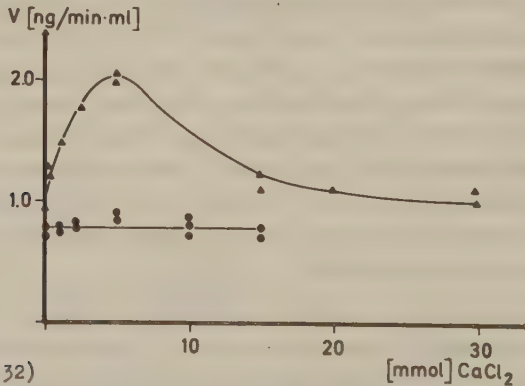


Abb. 12: (32)

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der CaCl_2 -Konzentration in destilliertem Wasser als Lösungsmittel (Dreiecke) und in 0,9 %iger NaCl-Lösung (Punkte)

Abszisse: CaCl_2 -Konzentration der Inkubationslösung

Ordinate: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v [$\text{ng/min} \cdot \text{ml}$]

Die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der CdCl_2 -Konzentration zeigt ein anderes Verhalten. Wie aus der Abb. 13 hervorgeht, ist die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit

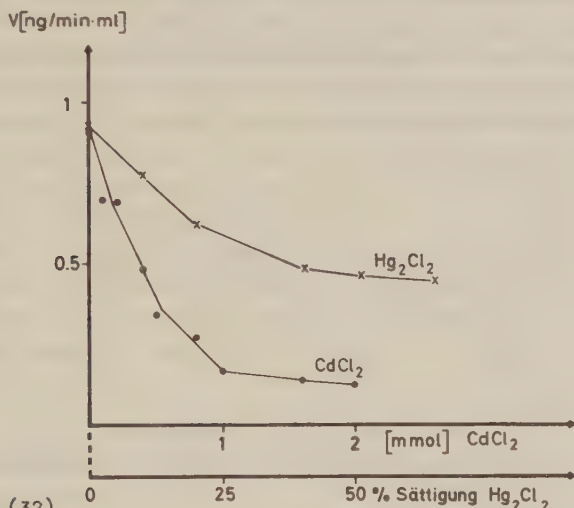


Abb. 13: (32)

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der CdCl_2 - bzw. Hg_2Cl_2 -Konzentration des Inkubationsmediums
Abszissen: CdCl_2 - bzw. Hg_2Cl_2 -Konzentrationen der Inkubationslösungen

Ordinate: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v [ng/min. · ml]

schon im Bereich von 0 - 0,5 mmol CdCl_2 stark reduziert. Ein anfänglicher Anstieg der Reninaktivität im niedrigen Salzkonzentrationsbereich, wie er bei den vorangehend besprochenen Elektrolyten beobachtet wurde, konnte hier nicht festgestellt werden. Die Veränderung der CdCl_2 -Konzentration in 0,9 %-iger NaCl-Lösung zeigt das gleiche Verhalten wie die Veränderung der Konzentration dieser Salze in destilliertem Wasser.

Das mit Cadmium in der gleichen Gruppe des Periodischen Systems der chemischen Elemente stehende Quecksilber verhielt sich als Hg_2Cl_2 in sonst elektrolytfreiem Medium dem CdCl_2 sehr ähnlich. Wegen der geringen Löslichkeit des Hg_2Cl_2 ist eine zahlenmäßige

Konzentrationsangabe nur schwer möglich (Löslichkeit von Hg_2Cl_2 in H_2O bei 20°C : $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ g } \%$).

B) Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von dem Harnstoffgehalt des Inkubationsgemisches

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Konzentration des Nichtelektrolyten Harnstoff im Inkubationsmedium untersucht. Wie aus Abb. 14

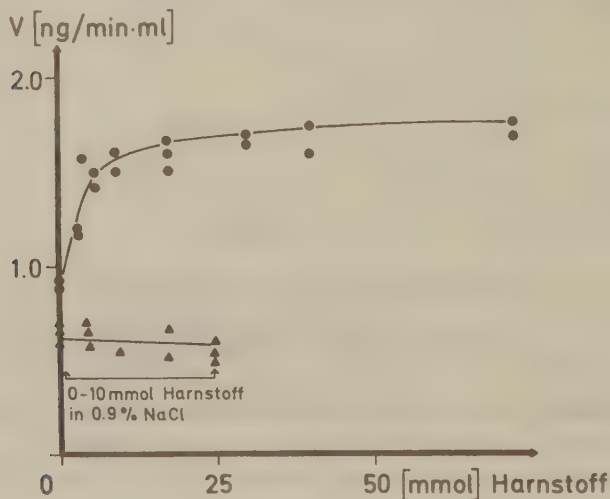


Abb. 14: (32)

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der Harnstoffkonzentration in destilliertem Wasser als Lösungsmittel (Punkte) und in 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Dreiecke)
Abszissen: Harnstoffkonzentration der Inkubationsmedien
Ordinate: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v [$\text{ng/min} \cdot \text{ml}$]

hervorgeht, beeinflusst eine Veränderung der Harnstoffkonzentration in 0,9 %-iger NaCl-Lösung (0 - 10 mmol Harnstoff) die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit nicht. Verändert man jedoch den Harnstoffgehalt in einer elektrolytfreien Lösung von 0 - 70 mmol, so läßt sich bis ca. 15 mmol eine starke Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachten, die ab 25 mmol Harn-

stoff konstant bleibt. Die maximal beim Harnstoff erreichte Reaktionsgeschwindigkeit entspricht etwa den gemessenen Höchstwerten bei den vorher besprochenen Alkalisalzen (NaCl , NaBr , KCl , Na_2SO_4 und CaCl_2).

b) Das System: Menschliches Renin und homologes Substrat

Da für das System: Schweinerenin und homologes Substrat gefunden wurde, daß die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums abhängig ist, sollte untersucht werden, ob sich dieser Befund auch für das entsprechende menschliche System bestätigen läßt. Für die quantitative Bestimmung unbekannter Reninaktivitäten müßte die Zusammensetzung des Inkubationsmediums dann so gewählt werden, daß die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit durch kleine Veränderungen der Ionenstärke gar nicht oder nur sehr wenig beeinflusst wird.

c) Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der NaCl -Konzentration des Inkubationsgemisches bei verschiedenen Reninsubstratgehalten

In der Abb. 15 ist die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit aus menschlichem Angiotensinogen und homologem Renin von der NaCl -Konzentration des Inkubationsgemisches dargestellt. Die Untersuchungen wurden bei einer nahe dem Sättigungsbereich liegenden Reninsubstratkonzentration von 600 ng/ml und bei einer niedrigen Reninsubstratkonzentration von 120 ng/ml durchgeführt. Es zeigte sich bei der niedrigen Reninsubstratkonzentration (120 ng/ml) ein ähnlicher Kurvenverlauf, wie er bei niedrigen Schweinesubstratkonzentrationen (220 ng/ml) und homologem Renin für NaCl , NaBr , KCl , Na_2SO_4 und CaCl_2 gefunden wurde. Allerdings ist das Maximum der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei 15-20 mmol NaCl bei menschlichem Renin und homologem Substrat nicht so ausgeprägt. Bei fünf-fach höheren Reninsubstratkonzentrationen (600 ng/ml) wurde dieser typische Kurvenverlauf nicht gefunden. Möglicherweise ist dafür der ebenso um den Faktor fünf höhere Proteingehalt der Inkubationslösung verantwortlich (17, 32).

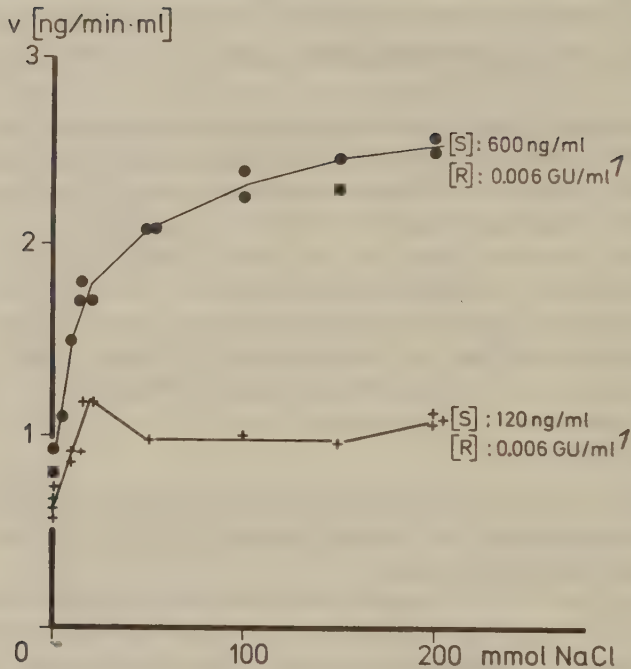


Abb. 15:

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der NaCl-Konzentration des Inkubationsmediums bei niedrigen (Kreuze) und hohen Reninsubstratkonzentrationen (Punkte)

Abszisse: NaCl-Konzentration der Inkubationslösung

Ordinate: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v [$\text{ng/min} \cdot \text{ml}$]

(Spezifischer Substratgehalt in beiden Fällen gleich)

B) Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Phosphatpufferkonzentration des Inkubationsgemisches bei hohen Reninsubstratgehalten

Da für quantitative Messungen von Mikroreninaktivitäten Substratkonzentrationen möglichst im Sättigungsbereich gewählt werden, und als Lösungsmittel ein Puffersystem zweckmäßig ist, wurde für die folgenden Untersuchungen ein entsprechendes Reaktionssystem

¹/ 1 GU = 1 GE = 1 Goldblatteinheit (siehe S. 25)

verwendet. In der Abb. 16 ist die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Phosphatpufferkonzentration unter Verwendung hoher Angiotensinogenkonzentrationen (600 ng/ml) aufgetragen. Es findet sich ein gleichartiger Kurvenverlauf, wie er in Abb. 15 für die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der NaCl-Konzentration bei hohen Reninsubstratkonzentrationen ermittelt wurde.

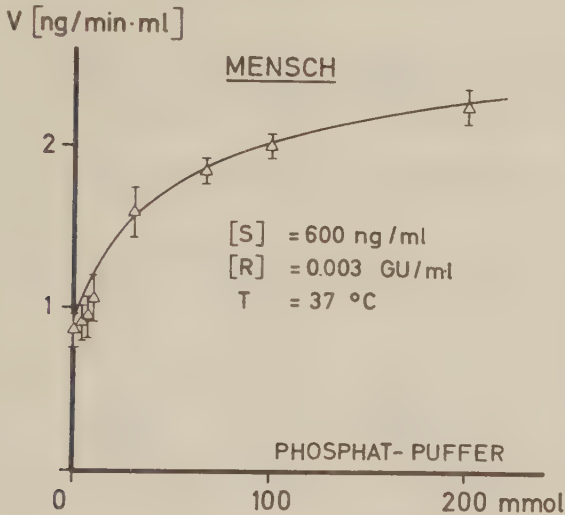


Abb. 16:

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der Phosphatpufferkonzentration des Inkubationsgemisches bei Verwendung hoher Reninsubstratkonzentrationen

Abszisse: Phosphatpufferkonzentration des Inkubationsmediums

Ordinate: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v [ng/min. · ml]

5) Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m und Maximalen

Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} der Systeme:

Menschliches Renin - fünf angereicherte Angiotensinogene

Nach Ermittlung der jeweiligen pH-Optima für die Angiotensinbildung aus verschiedenen Reninsubstraten, wurden die nachfolgenden Untersuchungen einheitlich bei einer Inkubations-

temperatur von 37°C in einem 150 mmolaren Phosphatpuffer durchgeführt. Die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Reninsubstratkonzentration zeigt die Abb. 17. Dabei

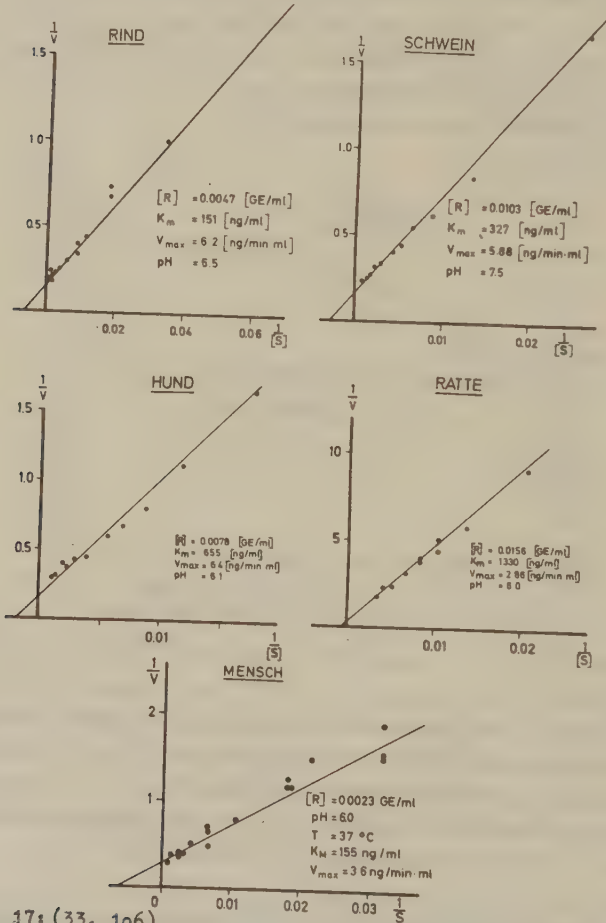


Abb. 17: (33, 106)

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der Reninsubstratkonzentration fünf verschiedener Spezies. Auftragung nach Lineweaver-Burk

Abszissen: Reziproke Reninsubstratkonzentration $\frac{1}{S}$

Ordinaten: Reziproke Angiotensinbildungsgeschwindigkeit $\frac{1}{v}$

wurden die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten $V_{\max}$ und Michaelis-Menten-Konstanten K_m nach Lineweaver-Burk durch doppelt reziproke Auftragung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v und der Substratkonzentration S ermittelt. Der Ordinatenabschnitt der berechneten Regressionsgeraden liefert den reziproken Wert für die maximale Angiotensinbildungsgeschwindigkeit, der Abszissenabschnitt den negativen reziproken Wert für die Michaelis-Menten-Konstante.

Die numerischen Werte für die verwendeten Reninkonzentrationen, für die pH-Werte, für K_m und $V_{\max}$ sowie für die berechneten Reaktionskonstanten $\frac{V_{\max}}{GE}$ sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Reaktionskonstanten fünf angereicherter Angiotensinogene mit menschlichem Renin

Substrat von	Renin [GE/ml]	$V_{\max}$ [ng/min·ml]	$V_{\max}/R$ [ng/min·GE]	K_m [ng/ml]	pH
Mensch	0,0023	3,6	1540	155	6,0
Rind	0,0047	6,2	1320	151	6,5
Schwein	0,0103	5,88	570	327	7,5
Hund	0,0078	6,4	820	655	6,1
Ratte	0,0156	2,86	183	1330	6,0

Die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von der Reninsubstratkonzentration fünf verschiedener Spezies ist in der Abb. 18, berechnet auf eine einheitliche Reninkonzentration von 0,01 GE/ml Inkubationsgemisch, dargestellt. Es ist hier deutlich die Abnahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit vom menschlichen Reninsubstrat zum Rattensubstrat unter Verwendung menschlichen Renins zu sehen.

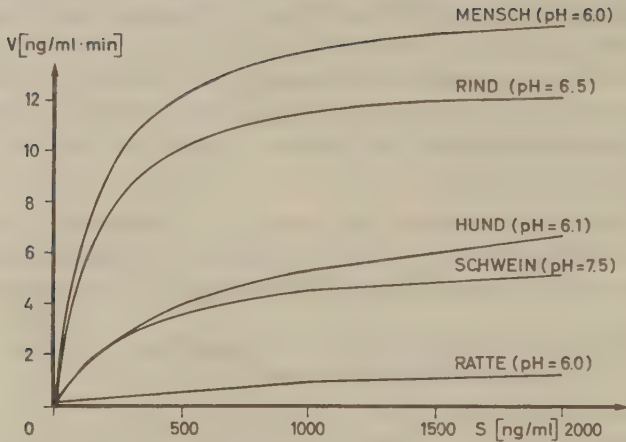


Abb. 18: (106)

Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v von der Reninsubstratkonzentration fünf verschiedener Spezies, berechnet für die einheitliche Reninkonzentration von $0,01 \text{ GE/ml}$

Abszisse: Reninsubstratkonzentration S [ng/ml] (ausgedrückt als ng Hypertensin (Ciba) gleicher pressorischer Aktivität, wie das durch Inkubation mit einem Überschuß an menschlichem Renin freisetzbare Angiotensin)

Ordinate: Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v [ng/min. · ml]

V Identifizierung und Differenzierung der gebildeten Angiotensine

Um zu klären, ob die jeweils gebildete, pressorisch wirksame Substanz Angiotensin ist, wurden die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt. Die unter Punkt V, 1 und 2 genannten Bestimmungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. J. Rosenthal, I. Med. Klinik und Poliklinik der Universität Mainz, durchgeführt.

1) Papierchromatographie

Die aus den fünf Reninsubstraten freigesetzten Pressorsubstanzen wurden eingeeengt, in 0,3 ml wässrigem Methanol (80 %) aufgelöst und auf einem 15 cm breiten Chromatographiestreifen aufgetragen. Nach Imprägnierung mit n-HCl und Trocknung, wurde nach zweistündiger Äquilibrierung aufsteigend mit einem n-Butanol-Wasser-Essigsäure-Gemisch (45 zu 50 zu 10) über 10 Stunden bei Zimmertemperatur chromatographiert. Der R_f -Wert für Hypertensin (Ciba) als Standard lag bei 0,30 bis 0,32. Die aus den fünf Reninsubstraten freigesetzten pressorisch wirksamen Substanzen lagen mit ihren R_f -Werten ebenfalls in diesem Bereich. Für den Angiotensintest an der Ratte wurde das streifenförmig aufgeschnittene Chromatographiepapier mit etwa 30 ml einer Lösung aus Äthanol (95 %)-Wasser-nHCl (500 : 495 : 5) eluiert. Jedes Eluat wurde erneut eingeeengt, in 0,4 ml Äthanol (20 %) aufgenommen und auf den Angiotensingehalt getestet (33).

2) Chymotrypsinbehandlung

Die aus den fünf Reninsubstraten entwickelten Pressorsubstanzen konnten durch kurzfristige Inkubation mit einer 10 %-igen Chymotrypsinlösung bei Zimmertemperatur inaktiviert werden. In allen Fällen genühten bei Enzymüberschuß nur wenige Sekunden, um die pressorische Wirkung vollständig aufzuheben (73).

3) Reaktionskinetische Erfassung des enzymatischen Angiotensinabbaues durch menschliche Erythrozytenangiotensinase

Wie von Dahlheim abgeleitet wurde (24), ist die Angiotensinaseaktivität der Halbwertszeit $\frac{T}{2}$ des Angiotensinasesubstrates (Angiotensin) umgekehrt proportional. Es wurde deshalb $\frac{T}{2}$ als Maß für die enzymatische Inaktivierung der geschilderten Pressor-

substanzen gewählt. Die Messungen wurden in einem 150 mmolaren Phosphatpuffer und bei 37°C durchgeführt. Als angiotensinhaltiges Präparat dienten gewaschene, hämolysierte und gefriergetrocknete menschliche Erythrozyten. Dieses Hämolysat wurde in einer Konzentration von 13 mg/ml Inkubationsgemisch verwendet (95, 96).

a) pH-Abhängigkeit der menschlichen Erythrozytenangiotensinaseaktivität, gemessen am enzymatischen Abbau des menschlichen Angiotensins

Zur Bestimmung des pH-Optimums der menschlichen Erythrozytenangiotensinase wurde die Abhängigkeit des Abbaues menschlichen Angiotensins vom pH des Inkubationsmediums (in einem 150 mmolaren Phosphatpuffer) untersucht. Dieses natürliche Angiotensin wurde

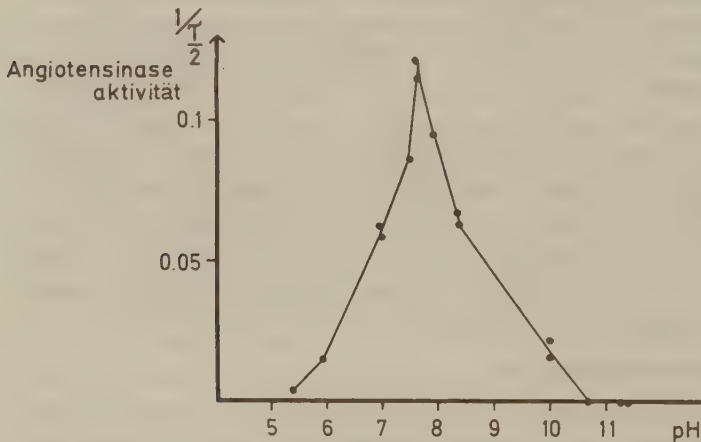


Abb. 19:

Abbau von menschlichem Angiotensin durch homologe Erythrozytenangiotensinase in Abhängigkeit vom pH des Inkubationsmediums
Abszisse: pH-Wert des Inkubationsmediums

Ordinate: Angiotensinaseaktivität, ausgedrückt als reziproke Halbwertszeit $1/T/2$ von menschlichem Angiotensin

durch Inkubations von menschlichem, angereichertem Reninsubstrat (33) mit menschlichem Renin (61, 63) hergestellt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der getesteten Angiotensinasepräparation

findet sich im physiologischen pH-Bereich bei etwa 7,5 (30, 106). Dieser pH-Wert wurde einheitlich für die Untersuchungen des Abbauverhaltens der Angiotensine fünf verschiedener Spezies gewählt.

b) Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Inaktivierung von Angiotensinen fünf verschiedener Spezies

Die Ausgangskonzentrationen der Angiotensine betragen jeweils 25 ng/ml Inkubationsgemisch, ausgedrückt als ng Hypertensin (Ciba) gleicher pressorischer Aktivität. Diese Konzentration

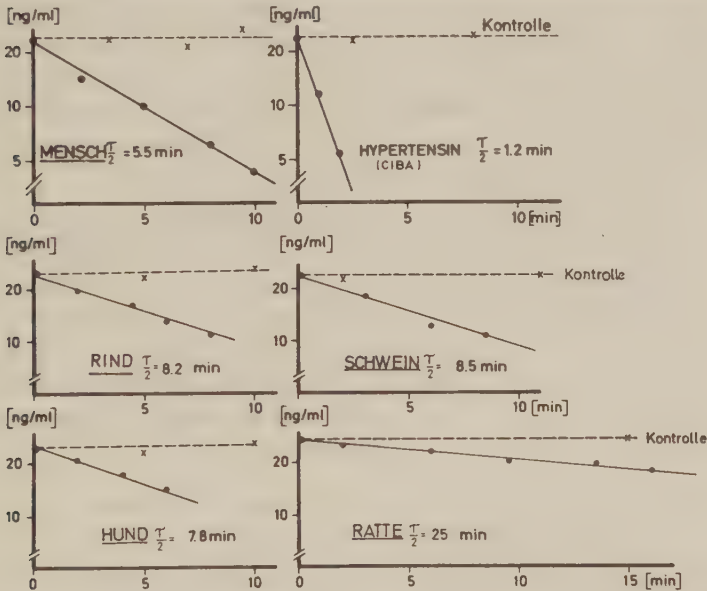


Abb. 20: (32, 106)

Reaktionskinetische Messung des Angiotensinabbaues fünf verschiedener Spezies und von synthetischem Angiotensin-II-amid durch menschliche Erythrozytenangiotensinase

Abszissen: Inkubationszeit

Ordinaten: Logarithmus der jeweiligen Angiotensinkonzentration ($\frac{T}{2}$ ist die Zeit, in der die Ausgangskonzentration des Angiotensins durch die Angiotensinase um die Hälfte vermindert wird.) (30)

liegt im optimalen Bereich der Angiotensinempfindlichkeit der Testratten. Der reaktionskinetische Verlauf des Abbaues der verschiedenen Angiotensine ist in der Abb. 20 dargestellt. Auf den Ordinaten ist der Logarithmus der jeweiligen Angiotensinkonzentrationen, auf den Abszissen sind die Inkubationszeiten aufgetragen. Die Abbaugeschwindigkeit wird als Halbwertszeit $\frac{T}{2}$ ausgedrückt. Sie beträgt für das Rinder-, Schweine- und Hundeangiotensin übereinstimmend etwa 8 min. Für das menschliche Angiotensin etwa 5,5 min. und für das der Ratte 25 min. Die Halbwertszeit des synthetischen Val⁵-Angiotensin-II-amids (Hypertensin, Ciba) liegt vergleichsweise bei 1,2 min. Als Kontrolle wurden gleiche Ausgangskonzentrationen der Angiotensine ohne Angiotensinasezusatz inkubiert. Innerhalb der Versuchsdauer von 10 - 20 min. konnte kein meßbarer Abbau festgestellt werden.

In der nachstehenden Tabelle 6 sind die ermittelten Halbwertszeiten $\frac{T}{2}$ sowie die bekannten Aminosäuresequenzen der Angiotensine zusammengestellt. (Soweit bisher bekannt ist, unterscheiden sich die natürlichen Angiotensine sowie das synthetische Hypertensin, Ciba, lediglich durch die Aminosäure in Stellung 5 voneinander.) Daraus geht hervor, daß die unterschiedlichen Abbauraten der hier verglichenen Angiotensine nicht auf deren Aminosäuresequenz zurückzuführen sind.

Tabelle 6: Halbwertszeiten und Aminosäuren in Stellung 5 der fünf gebildeten Angiotensine

Spezies	Mensch	Rind	Schwein	Hund	Ratte	Hypertensin Ciba
$\frac{T}{2}$ in min.	5,5	8,2	8,5	7,8	25	1,2
AS. in Stellung 5	Ileu ⁵	Val ⁵	Ileu ⁵			Val ⁵ -amid

4) Differenzierung eines Angiotensingemisches in Angiotensin-I und -II durch den Ratten- und Aortenstreifentest

Während die Blutdruckanstiege auf Angiotensininjektionen bei der Ratte keine Differenzierung in Angiotensin-I und -II erlauben, kann mit dem Aortenstreifentest nach Helmer (68) das Angiotensin-II quantitativ erfaßt werden. Denn das Angiotensin-I

ist an isolierten Gefäßstreifen nicht konstriktorisch wirksam, da diese kein oder nur sehr wenig converting-enzyme-Aktivität besitzen (23, 68).

a) Aortenstreifentest nach Helmer

20 - 25 mm lange und etwa 4 mm breite, aus spiralig aufgeschnittenen Kaninchen-Aorten gewonnene Gefäßstreifen wurden in einer Krebs-Henseleit-Lösung von 37°C mit 500 - 1000 mg vorgespannt. Die Lösung wurde kontinuierlich mit Karbogen durchperlt und hatte nachfolgende Zusammensetzung: NaCl (119 mmol), KCl (4,0 mmol), KH_2PO_4 (1,18 mmol), MgSO_4 (1,17 mmol) NaHCO_3 (2,1 mmol) und Glukose (5,5mmol) (131).

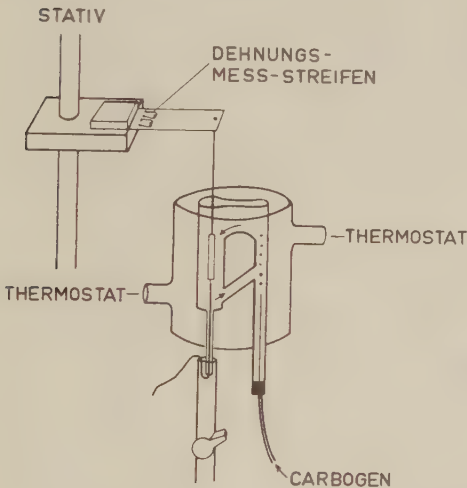


Abb. 21: (131)

Anordnung zur Messung der Spannungsänderung eines spiralig aufgeschnittenen Gefäßstreifens (Kaninchenaorta)

Die durch den Angiotensin-II-Gehalt einer Testlösung bewirkte Verkürzung des Teststreifens wird mit einem Shinkoh-Strain-gauge über die Hellige-Widerstandsmeßbrücke gemessen und auf einem Rikadenki-Direktschreiber fortlaufend registriert. Als Eichlösung dient das auch beim Rattentest verwendete synthetische Val⁵-Angiotensin-II-amid (Hypertensin, Ciba). Nach jeder Bestimmung wird das die Test- bzw. Eichlösung aufnehmende Gefäß einige Male mit der Krebs-Henseleit-Lösung ausgespült. Auf diese Weise werden Resteder pressorischen Substanzen von dem

in diesem Gefäß ausgespannten Aortenstreifen entfernt. Als Kontrolle dient die auf den Ursprung zurückgekehrte Spannung des Streifens.

- b) Angiotensin-I und -II-Gehalte der aus fünf verschiedenen, angereicherten Reninsubstraten freigesetzten Pressorsubstanzen
Der Angiotensin-II-Gehalt der freigesetzten Angiotensine wurde mit Hilfe des Aortenstreifentests bestimmt. Die Gesamtkonzentration des Angiotensin-I-II-Gemisches wurde im Rattentest ermittelt. Die Angiotensinlösungen wurden auf gleiche pressorische Aktivität eingestellt und dann am Aortenstreifen des Kaninchens der Angiotensin-II-Gehalt bestimmt. Die vorhandene Angiotensin-I-Aktivität ergibt sich dann durch Differenzbildung. Die Ergebnisse für die Angiotensine, die aus den angereicherten Reninsubstraten freigesetzt wurden, sind aus der Abb. 22 zu ersehen.

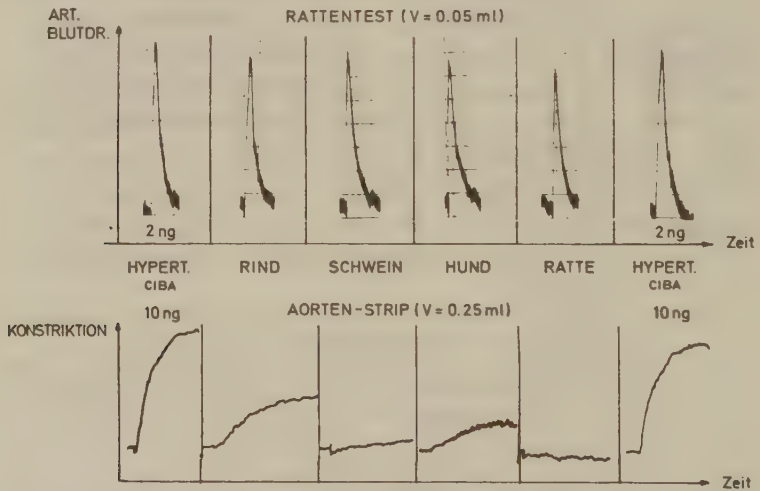


Abb. 22: (32)

Vergleich der freigesetzten Angiotensinaktivitäten von Rind, Schwein, Hund, Ratte und Hypertensin (Ciba) als Standard
Oben: Rattentest (Gesamtaktivität); injizierte Volumen: 0,05 ml
Unten: Aortenstreifentest (Angiotensin-II-Aktivität); zu dem Gefäßstreifen gegebenes Volumen: 0,25 ml

Das aus dem Rindersubstrat freigesetzte Angiotensin zeigt auch am Gefäßstreifen eine deutliche konstriktorische Aktivität. 40 % der mit dem Rattentest erfaßten Aktivität konnte am Aortenstreifen als Angiotensin-II identifiziert werden. Auch die aus dem Hundesubstrat gebildete pressorische Substanz erwies sich als ein Angiotensingemisch, das 20 - 30 % Angiotensin-II enthielt. Dagegen ließ sich im Aortenstreifentest beim Ratten-, Schweine- und menschlichen Reninsubstrat für das im Rattentest pressorisch wirksame Inkubationsgemisch kein Angiotensin-II nachweisen. Hieraus ist das unterschiedliche Anreicherungsverhalten der fünf untersuchten Reninsubstrate hinsichtlich der converting-enzyme-Abtrennung zu ersehen. Bei dem aus Rinder- bzw. Hundeserum angereicherten Angiotensinogen konnte das converting-enzyme nicht vollständig abgetrennt werden, was diese Präparationen für die Bestimmung von Renin- und converting-enzyme-Aktivitäten in Gewebe weniger geeignet erscheinen läßt. Wahrscheinlich lassen sich aber auch diese beiden Reninsubstrate durch Weiterentwicklung der angegebenen drei Anreicherungsstufen converting-enzyme-frei gewinnen.

VI Über die Bestimmung von Mikroreninaktivitäten im menschlichen Gewebe
Folgende Kriterien sind zu berücksichtigen:

- 1) Auswahl eines Reninsubstrates, welches eine möglichst große Reaktionskonstante $\frac{V_{max}}{K_m}$ und eine möglichst kleine Michaelis-Menten-Konstante K_m für die Umsetzung mit menschlichem Renin besitzt. Von den von uns untersuchten Angiotensinogenen fünf verschiedener Spezies (Mensch, Rind, Schwein, Hund und Ratte) erweist sich, nach dem menschlichen Reninsubstrat, das Rindersubstrat als am günstigsten. Jedoch läßt sich ein noch besser geeignetes Reninsubstrat, wie z.B. das Schafangiotensinogen finden (34, 116). Bei der Auswahl des Angiotensinogens spielt darüberhinaus auch dessen Anreicherungsverhalten eine wichtige Rolle. Wie vorangehend beschrieben, lassen sich z.B. mit der hier angegebenen Methode nicht alle untersuchten Reninsubstrate gleich gut anreichern (30).
- 2) Abtrennung von begleitenden, störend einwirkenden Enzymen wie Renin, Angiotensinasen und nach Möglichkeit converting-enzyme (29).
- 3) Aufschluß des zu untersuchenden, reninhaltigen Materials durch Homogenisation (23, 51, 122).
- 4) Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen (pH, Substratkonzentration, Ionenstärke, Temperatur) für die enzymkinetischen Untersuchungen (33).
- 5) Kurze Inkubationszeiten durch Verwendung kleiner Inkubationsvolumina. (33). Bei längeren Inkubationszeiten, besonders über mehrere Tage, ist zu berücksichtigen, daß die Reninaktivität mit der Zeit vermindert wird, bzw. daß ein in der zu untersuchenden Reninprobe enthaltener Renininhibitor sich immer stärker auswirkt (64).

So konnte z.B. gezeigt werden, daß das hier verwendete, hochangereicherte menschliche Renin eine Halbwertszeit von etwa 70 Std. aufweist. Es wurden in einem 150 mmolaren Phosphatpuffer bei pH 6,0 steril angesetzte Proben menschlichen Renins gleicher Konzentration für 1 - 96 Std. bei 37°C mit und ohne Zusatz von Antibiotika vorinkubiert. Nach verschiedenen langen Vorinkubationszeiten wurde die Reninaktivität dieser Proben

unter Zusatz gleicher Reninsubstratmengen über die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit gemessen. Das Ergebnis ist in der Abb. 23 graphisch dargestellt.

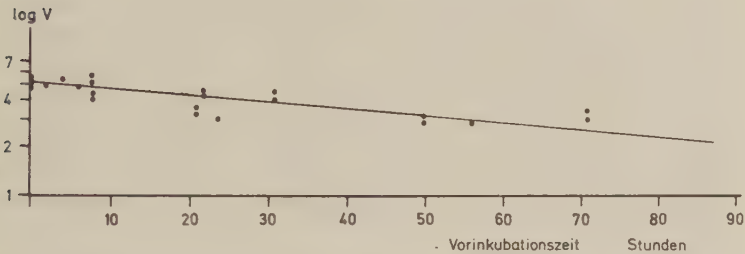


Abb. 23:

Inaktivierung eines hochangereicherten menschlichen Renins bei 37°C , gemessen über die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit (Die Inkubationen wurden ohne Zusatz von Albumin durchgeführt)
Abszisse: Vorinkubationszeit des Renins bei 37°C in Stunden
Ordinate: Logarithmus der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v

- 6) Qualitative und quantitative Nachweismethode des gebildeten Angiotensins.
- 7) Ein wesentliches Problem bei der Reninbestimmung (besonders im Mikromaßstab) ist die Eliminierung der im System enthaltenen Angiotensinaseaktivitäten. Es existieren drei Möglichkeiten:
 - a) Partielle Blockierung der Angiotensinasen, z.B. durch EDTA, DFP oder Trasylol (95).
 - b) Sofortige Bindung des gebildeten Angiotensins an Dowex und hierdurch Schutz vor Inaktivierung durch Angiotensinasen (8, 9).
 - c) Quantitative Messung der Angiotensinaseaktivitäten und Berücksichtigung dieser bei der Ermittlung der Reninaktivität über die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit (34).

VII

Diskussion

Enzymkinetische Untersuchungen mit menschlichem Renin an einzelnen tierischen Reninsubstraten sind bereits von mehreren Autoren durchgeführt worden (16, 55, 99, 116).

Mit der vorliegenden Arbeit sollten unter übereinstimmenden Bedingungen die Michaelis-Menten-Konstanten und Reaktionskonstanten der Umsetzungen des menschlichen Renins mit fünf verschiedenen Reninsubstraten ermittelt werden. Ein uns von Herrn Dr. E. Haas, Cleveland, Ohio, zur Verfügung gestelltes, hochangereichertes Renin (61-63) sowie von uns entwickelte Methoden zur Herstellung hochangereicherter Angiotensinogene (26, 31), waren hierfür eine günstige Voraussetzung.

Unter einheitlichen Anreicherungs- und Testbedingungen konnte herausgefunden werden, welches der fünf angereicherten Angiotensinogene (von Mensch, Schwein, Rind, Hund und Ratte) für die Bestimmung kleiner Reninaktivitäten in menschlichen Gewebshomogenaten (z.B. in einzelnen juxtaglomerulären Apparaten der Niere, in Gefäßwandungen oder im Uterus) am besten geeignet ist (2-4, 15, 43, 54, 59, 80, 104, 107, 118, 120, 134). Die Angiotensinbestimmung wurde über den Blutdruckanstieg narkotisierter Ratten durchgeführt. Die hohe Nachweisempfindlichkeit (ng-Bereich) und die Schnelligkeit sind die besonderen Vorteile dieser Meßmethode. So ist in einfacher Weise die reaktionskinetische Ermittlung der Reninaktivität über die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit möglich.

Andere, rein chemische bzw. chromatographische Verfahren sind entweder wegen zu geringer Empfindlichkeit, wegen eines größeren Zeitaufwandes oder wegen der obligatorischen Verwendung von synthetischen Substraten für die enzymkinetische Mikroreninbestimmung, nicht so geeignet. (102, 113, 136). Der kürzlich von Peart et al. (11), Haber et al. (65) und anderen Untersuchern entwickelte Angiotensinradioimmunoassay (18, 46, 71, 91) könnte auf dem Gebiet der Angiotensinmessung wegen der ebenfalls sehr hohen Empfindlichkeit einen neuen Weg weisen. Jedoch ist anzunehmen, daß dieses Verfahren besonders für die in-vivo-Bestimmungen von

Angiotensinaktivitäten zur Anwendung kommen wird (64). Bei Beginn dieser Arbeit stand die Verwendung der letztgenannten Methode noch nicht zur Verfügung, da deren Entwicklung nicht abgeschlossen war.

Gegenüber den chromatographischen Differenzierungs- bzw. Trennungsmethoden von Angiotensin-I und -II von Wisenbaugh (136), wobei die Messungen im μg -Bereich erfolgen, bietet das von uns angewendete Verfahren der biologischen Angiotensindifferenzierung am Aortenstreifen des Kaninchens nach Helmer (68) die größere Empfindlichkeit. So können nach der hier aufgeführten Methode Angiotensin-I und -II-Mengen im ng -Bereich analysiert werden, was für die Bestimmung von Mikrorenin- oder Mikro-converting-enzyme-Mengen im Gewebe von großer Wichtigkeit ist. (51). Allerdings weist das Verfahren nach Helmer Nachteile bezüglich des Probendurchsatzes (eine Bestimmung dauert ca. $1/2 - 1$ Std.) und der möglichen Tachyphylaxie des Aortenstreifens auf (131).

Die beschriebenen Befunde über die Reinigung der natürlichen Reninsubstrate zeigen, daß durch Kombination der drei hier verwendeten Trennverfahren Anreicherungen im präparativen Maßstab um den Faktor 50 - 1000 (je nach Spezies) erreicht werden können. Dabei sind die ersten zwei Anreicherungsstufen - fraktionierte NaCl -Fällung bei $\text{pH } 3,2$ bzw. fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bei $\text{pH } 7,5$ und die Sephadex-Gel-Filtration am Gel G-75 bei $\text{pH } 6,0$ - technisch einfach und ermöglichen einen großen Substanzdurchsatz.

Gemessen an der guten Anreicherung ($f = 5,6$) ist auch die als dritte Stufe verwendete Acrylamid-Disk-Elektrophorese nach Dr. L. Strauch (119) als nützlich anzusehen.

Ein weiterer Vorteil der verwendeten Methoden ist es, kleine Substanzmengen auftrennen zu können, da die Ausbeute hoch ist, und sich die Verfahren für verschieden große Proteinmengen anwenden lassen. Mit den drei Anreicherungsstufen lassen sich weiterhin die Reinheitskriterien des Reninsubstrates bezüglich Renin-, Angiotensinase- und converting-enzyme-Freiheit in schonender Weise befriedigend erfüllen. Die unter III, 1 a-d

beschriebene Anreicherung des menschlichen Angiotensinogens bis zu einem spezifischen Substratgehalt von 500 ng/mg Protein zeigt dies als Beispiel. In dieser Präparation ist bei Inkubation innerhalb von 10 Std. keine Renin- bzw. Angiotensinaseaktivität nachweisbar und wurde auch keine converting-enzyme-Aktivität festgestellt.

Da menschliches Plasma zur Gewinnung des Angiotensinogens nur in relativ geringen Mengen zur Verfügung steht, ist es zweckmäßig, für routinemäßige Bestimmungen menschlicher Reninaktivitäten geeignete tierische Reninsubstrate zu verwenden. Für die Aufklärung des Reaktionsverhaltens des homologen menschlichen Renin-Angiotensin-Systems ist es erforderlich, auch angereichertes menschliches Angiotensinogen herzustellen.

Die Herstellung der fünf angereicherten Reninsubstrate (Mensch, Schwein, Hund, Rind und Ratte) und die vergleichenden Messungen der Reaktionskonstanten nach Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen ermöglichte die Bearbeitung dieser beiden Probleme.

Bei der Auswahl eines geeigneten Angiotensinogens für Mikroreninbestimmungen, spielt neben dem Anreicherungsverhalten (siehe III, 2) die Reaktionsgeschwindigkeit der Angiotensinbildung eine wesentliche Rolle. Diese läßt sich aus den reaktionskinetisch ermittelten Konstanten K_m und $\frac{V_{max}}{GE}$ ($=K$) über die Michaelis-Menten-Beziehung bestimmen.

$$v = \frac{K \cdot R^1 \cdot S}{K_m + S} \quad (I)$$

Die bei den enzymkinetischen Messungen verwendeten Reninsubstratkonzentrationen lagen weit unterhalb des Substratsättigungsbereiches, in der Regel in dem linearen Bereich der Michaelis-Menten-Beziehung. Bei diesen niedrigen Substratkonzentrationen ist zu berücksichtigen, daß mit zunehmender Reaktionszeit die Reaktionsgeschwindigkeit infolge des fortlaufend verminderten Substratgehaltes abnimmt. Bei sehr niedrigem S wird aus der

^{1/} R = Reninkonzentration

Michaelis-Menten-Beziehung:

$$v = \frac{K \cdot R \cdot S}{K_m} \quad (II)$$

Da die Meßempfindlichkeit für das gebildete Angiotensin im ng-Bereich liegt, kann die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit innerhalb von 20 - 40 min. ermittelt werden (siehe Abb. 8). Hierbei beträgt der Angiotensinogenabbau unter den gewählten Versuchsbedingungen weniger als 15 %. Diese Reninsubstratabnahme in dem Inkubationsgemisch ist gegenüber der biologischen Meßgenauigkeit für das gebildete Angiotensin jedoch vernachlässigbar klein.

Das menschliche Renin reagiert mit den Reninsubstraten von Rind, Mensch, Ratte und Hund in einem pH-Bereich um 6,0 optimal, während bei der Verwendung von Schweineangiotensinogen davon abweichend ein pH-Optimum von 7,5 gefunden wurde. Das pH-Optimum für das Rinderangiotensinogen und der Verlauf der pH-Abhängigkeit stimmen gut mit dem Ergebnis von Brown et al. (16) überein, für das menschliche Reninsubstrat mit den Ergebnissen von Pickens et al. (97) und Haas et al. (61) und für das Schweineangiotensinogen mit den von Gould et al. (55). Die pH-Abhängigkeiten für die Reninsubstrate von Rind, Schwein, Ratte und Mensch zeigen ein pH-Optimum, während für das Reninsubstrat des Hundes zwei pH-Optima zwischen pH 6 und 8 ermittelt wurden. Möglicherweise ist diese Doppelgipfeligkeit auf die Existenz von zwei Reninsubstratformen zurückzuführen (112, 135).

Die Temperaturabhängigkeit der Angiotensinbildung zeigt für alle untersuchten Reninsubstrate einen ähnlichen Kurvenverlauf. Die übereinstimmende Lage des Temperaturmaximums zwischen 55 und 58°C und des sich anschließenden steilen Abfalles läßt vermuten, daß dieses Verhalten durch die thermische Inaktivierung des menschlichen Renins bedingt ist. Schon Tigerstedt und Bergmann stellten fest (126), daß das von ihnen erstmals extrahierte Reninpräparat nur bis ca. 58°C temperaturbeständig ist.

Für die Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der Elektrolytkonzentration ist bei Verwendung niedriger Angiotensinogenkonzentrationen (Proteinkonzentration im Inkubationsansatz:

1 - 2 mg/ml) folgendes Verhalten charakteristisch:

Der steile Anstieg der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit v im Ionenstärkebereich von 0 - 20 mmol, ein anschließendes schmales Maximum und ein sich daran anschließender, hyperbelartiger Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit.

Eine Beeinflussung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit durch die Elektrolytkonzentration wurde auch von Bumpus (17) mitgeteilt. Die Reaktionsgeschwindigkeit war bei Substratkonzentrationen, die im Sättigungsbereich lagen, in elektrolytfreiem Inkubationsmedium meßbar, aber niedriger, als im physiologischen Ionenstärkebereich. Dieser Befund stimmt mit dem vorangehend erwähnten, der für niedrige Substratkonzentrationen erhoben wurde, nicht überein. Bumpus interpretiert seine Ergebnisse durch Annahme einer intermolekularen Wechselwirkung des Renins und des Angiotensinogens mit anderen Plasmaproteinen des Inkubationsmediums, die durch Erhöhung der Ionenstärke vermindert wird. Aus der durch die ansteigende Ionenstärke sich verringernden intermolekularen Wechselwirkung soll dann die erhöhte Angiotensinbildungsgeschwindigkeit resultieren.

In Übereinstimmung damit stehen diejenigen unserer Befunde, die bei hohen menschlichen Reninsubstratkonzentrationen ermittelt wurden. (Proteinkonzentration im Inkubationsansatz: ca. 6 - 8 mg/ml) (siehe Abb. 15 und 16). Es ergibt sich ein Ansteigen der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von elektrolytfreiem zu isotonem Inkubationsmedium sowohl bei Verwendung von NaCl, als auch für ein Phosphatpuffersystem. Allerdings sollte bei diesem Vergleich berücksichtigt werden, daß Bumpus infolge seines nicht angereicherten Reninsubstrates die Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei noch höheren Proteinkonzentrationen (ca. 80 mg/ml) gemessen hat.

Das unterschiedliche Verhalten der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit bei hohen und niedrigen Reninsubstratkonzentrationen ist somit entweder als Folge des unterschiedlichen Angiotensinogengehaltes oder als Folge des gleichzeitig veränderten Proteingehaltes der Inkubationslösung zu verstehen.

Die Abhängigkeit der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit von dem Harnstoffgehalt des Inkubationsmediums stimmt für niedrige Reninsubstratkonzentrationen mit dem der Alkalielektrolyte für hohe Reninsubstratkonzentrationen überein. Möglicherweise beruht das bei der Harnstoffabhängigkeit gefundene Verhalten auf der geringen elektrischen Polarität dieses Nichtelektrolyten und der dadurch bedingten geringen Neigung zur Hydratbildung. Der steile Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen (0 - 10 mmol) ist möglicherweise eine Folge der zunehmenden Proteinlöslichkeit (siehe Abb. 14). Während in harnstofffreier Lösung die Reaktionskomponenten teilweise an andere Proteine assoziiert sind, was zu einer Aktivitätsverminderung führen könnte, werden diese Assoziate mit ansteigender Harnstoffkonzentration aufgelöst, was zu einer Steigerung der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit führen könnte.

Verwendet man das dem Calcium chemisch verwandte Cadmium als CdCl_2 oder das in der gleichen Reihe des Periodischen Systems der Elemente stehende Quecksilber als Hg_2Cl_2 , so findet sich eine mit ansteigender Ionenkonzentration zunehmende Blockierung der Angiotensinbildung. Die starke Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei niedrigen CdCl_2 - und Hg_2Cl_2 -Konzentrationen läßt eine spezifische Einwirkung dieser Salze auf die Angiotensinbildung vermuten (29,32) (siehe Abb. 13). Eine denaturierende Einwirkung auf das Renin oder das Angiotensinogen durch das CdCl_2 wurde auch schon von Cook und Lee (19) für möglich gehalten.

Das vorangehend beschriebene Verhalten der Angiotensinbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums ist nicht für dieses System spezifisch. Auch die Abbaugeschwindigkeit des Angiotensins wird in gleicher Weise durch die Zusammensetzung des Inkubationsmediums beeinflusst (29).

Die Substratabhängigkeit der Angiotensinbildung wurde bei folgenden Inkubationsbedingungen untersucht:

150 mmolarer Phosphatpuffer als Inkubationslösung, jeweiliges

pH-Optimum, Temperatur 37°C.

Von den hier untersuchten fünf Reninsubstraten hat das menschliche Angiotensinogen die günstigsten Konstanten für die Umsetzung mit menschlichem Renin. Es findet sich eine Michaelis-Menten-Konstante K_m von 155 ng/ml und eine Reaktionskonstante $\frac{V_{max}}{R}$ von 1540 ng/min. • GE. Haas (61) ermittelte unter Verwendung von angiotensinasefreiem Plasma als Reninsubstrat für menschliches Renin eine Michaelis-Menten-Konstante von 185 ng/ml, die in etwa mit dem hier gefundenen Wert übereinstimmt, als Reaktionskonstante jedoch 560 ng/min. • GE, welche sich erheblich von dem o.g. Wert von 1540 ng/min. • GE unterscheidet. Wahrscheinlich beruht dieser Unterschied auf den voneinander abweichenden Versuchsbedingungen. Haas inkubierte sein angereichertes menschliches Renin in angiotensinasefreiem, menschlichem Serum bis zu einer Inkubationsdauer von 16 Std., wir benutzten angereichertes Angiotensinogen als Reninsubstrat und Inkubationszeiten bis zu 30 min.

Möglicherweise ist die erhebliche Differenz der Reaktionskonstanten, in deren Größen im Gegensatz zur Michaelis-Menten-Konstanten auch die verwendeten Reninkonzentrationen eingehen, aber auf die nicht exakt vergleichbaren Enzymkonzentrationen zurückzuführen. Diese wurden in GE angegeben (siehe a. Absatz IV, 1a) und ermöglichen nicht ohne weiteres eine kontrollierbare Standardisierung ohne die von Haas verwendeten Testhunde (62). Poulsen (99) ermittelte als Michaelis-Menten-Konstante für Katzensubstrat und menschliches Renin 69,4 ng/ml. Von diesem Autor wurde für menschliches Reninsubstrat und homologes Renin eine Michaelis-Menten-Konstante von 69,7 ng/ml angegeben. Die Michaelis-Menten-Konstante für die Angiotensinbildung aus Schafangiotensinogen mit menschlichem Renin wurde von Skinner ermittelt und betrug 120 - 180 ng/ml. Für dieses System soll die maximale Reaktionsgeschwindigkeit fünf mal größer als für das homologe menschliche System sein.

Der quantitative Vergleich mit den hier vorgelegten Befunden ist jedoch nicht möglich, da die jeweils verwendeten Reninkonzentrationen in verschiedenen Einheiten angegeben wurden,

die nicht untereinander verglichen werden konnten.

Von den vier untersuchten tierischen Reninsubstraten hat das des Rindes die günstigsten Reaktionskonstanten mit dem menschlichen Renin. Die ermittelten Werte für die Michaelis-Menten-Konstante von 151 ng/ml und für die Reaktionskonstante $\frac{V_{max}}{R}$ von 1320 ng/min. • GE liegen ganz in der Größenordnung der für das menschliche Renin-Angiotensin-System gefundenen Werte.

Die für das Schweine- und Hundesubstrat gemessenen Michaelis-Menten- und Reaktionskonstanten lassen erkennen, daß diese tierischen Reninsubstrate zur Ermittlung menschlicher Reninaktivitäten, insbesondere im Mikromaßstab, weniger geeignet sind (siehe Abb. 17 und 18 sowie Tabelle 5).

Die von A. Gould (55) für hochangereichertes Schweineangiotensinogen und menschliches Renin mitgeteilte Michaelis-Menten-Konstante (etwa 330 ng/ml) stimmt mit dem von uns für dasselbe System gefundenen Wert gut überein.

Für das Rattensubstrat ergab sich eine Michaelis-Menten-Konstante von 1300 ng/ml und eine Reaktionskonstante von 183 ng/min. • GE. Diese Werte zeigen, daß das Rattenangiotensinogen von den hier untersuchten Reninsubstraten am langsamsten mit menschlichem Renin reagiert und für die Bestimmung menschlicher Mikroreninaktivitäten nicht verwendet werden kann.

Durch die nachfolgend genannten Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß mit menschlichem Renin aus den fünf angereicherten Reninsubstraten ausschließlich Angiotensin als vasokonstriktorisch wirksame Substanz gebildet wurde:

- 1) Vollständige Inaktivierung der pressorisch wirksamen Substanzen durch α -Chymotrypsin.
- 2) Das Vorliegen anderer vasopressorischer Peptide in den untersuchten Inkubationsansätzen kann ausgeschlossen werden, da
 - a) die Angiotensinogene während der drei Anreicherungsstufen mehrere Male dialysiert wurden,
 - b) die Nullwerte und die zur Kontrolle ohne Reninzusatz inkubierten Leerwerte keine pressorische Aktivität zeigen,
 - c) durch fünfminütiges Kochen nach Ablauf der kinetischen Mes-

sungen alle höher molekularen Proteine denaturiert wurden.

3) Übereinstimmung der papierchromatographisch ermittelten R_f -Werte mit denen des synthetischen Val⁵-Angiotensin-II-amids.

4) Das reaktionskinetische Verhalten als Angiotensinasesubstrat beim Abbau mit menschlicher Erythrozytenangiotensinase. Die Untersuchung des enzymatischen Angiotensinabbaues mit menschlicher Erythrozytenangiotensinase ergab für Rinder-, Schweine- und Hundeangiotensine keinen signifikanten Unterschied der Abbaugeschwindigkeiten (siehe Abb. 20 und Tabelle 6). Die Halbwertszeiten $\frac{T}{2}$ lagen zwischen 7,8 und 8,5 min. Für das menschliche Angiotensin war die Halbwertszeit mit 5,5 min. etwas kleiner als bei den oben genannten. Das Rattenangiotensin wurde durch die menschliche Erythrozytenangiotensinase wesentlich langsamer abgebaut: $\frac{T}{2} = 25$ min.

Beim Vergleich dieser enzymatischen Abbaugeschwindigkeiten sollte jedoch die unterschiedliche Angiotensin-I- und -II-Zusammensetzung berücksichtigt werden, da wahrscheinlich beide Angiotensine von der Erythrozytenangiotensinase unterschiedlich schnell inaktiviert werden. Die für das Val⁵-Angiotensin-II-amid (Hypertensin, Ciba) mit menschlicher Erythrozytenangiotensinase ermittelte Halbwertszeit $\frac{T}{2}$ ist bedeutend kleiner (ca. 1/7), als die oben für die natürlichen Angiotensine angegebenen Werte und beträgt nur 1,2 min. Das stimmt mit den Befunden überein, die mit Schweineerythrozytenangiotensinase und homologem Angiotensin bzw. dem synthetischen Val⁵-Angiotensin-II-amid (Hypertensin, Ciba) erhoben wurden (24).

5) Das Verhalten im vergleichenden Ratten- und Aortenstreifen-test:

Die aus Ratten- und Schweinesubstrat freigesetzten Angiotensine waren an der spiralig aufgeschnittenen Kaninchenaorta (Gefäßstreifentest) nicht konstriktorisch wirksam (siehe Abb. 22). Ebenso verhielt sich das aus menschlichem Substrat freigesetzte Angiotensin. Daraus läßt sich schließen, daß aus diesen Angiotensinogenen nur Angiotensin-I gebildet wurde.

Dagegen waren die aus dem Hunde- und Rindersubstrat gebildeten Angiotensine auch am Gefäßstreifen aktiv, was auf das Vorliegen

von Angiotensin-II zurückgeführt werden muß. Bei den zuletzt genannten Substratpräparationen war es daher nicht gelungen, das converting-enzyme vollständig abzutrennen.

Das zur Inkubation verwendete, hochangereicherte menschliche Renin war frei von converting-enzyme-Aktivität.

VIII

Zusammenfassung

Mit Hilfe des biologischen Rattentestes wurde das Verhalten der Renin-Angiotensinogen-Reaktion unter verschiedenen Bedingungen enzymkinetisch untersucht. Auch der Abbau der entstandenen natürlichen Angiotensine wurde mit dieser Anordnung getestet. Am isolierten Aortenstreifen des Kaninchens wurden nach der Methode von Helmer die Reaktionsprodukte auf ihre Angiotensin-I- und -II-Identität geprüft.

Voraussetzung für alle diese enzymkinetischen Untersuchungen waren hochangereicherte Reaktionsstoffe. Die Angiotensinogene fünf verschiedener Spezies konnten über drei Anreicherungsstufen in genügender Weise gereinigt und auch von interferierenden Stoffen abgetrennt werden:

- 1) Fraktionierte NaCl- bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung.
- 2) G-75 Gel-Filtration (Sephadex).
- 3) Präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese.

Die verwendeten Renin-Präparationen wurden uns freundlicherweise von Dr. E. Haas, Cleveland, Ohio, zur Verfügung gestellt. Zur Frage des am günstigsten zu verwendenden Substrates für die Bestimmung von Mikro-Reninmengen in menschlichem Gewebe wurden die fünf angereicherten Substrate auf ihre Reaktionskonstanten hin vergleichend untersucht. Um jeweils optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, wurden für alle fünf Spezies die pH- und Temperatur-Abhängigkeiten bestimmt.

Das menschliche Substrat zeigte hinsichtlich der Michaelis-Menten-Konstanten K_m und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $V_{\max}$ die günstigsten Werte. Unter Berücksichtigung des Anreicherungsverhaltens sind auch die Substrate von Schwein und Rind für die Bestimmungen menschlicher Mikro-Reninmengen in Betracht zu ziehen. Das Rattenangiotensinogen ist aufgrund der ungünstigen Reaktionskonstanten, das Hunde-Angiotensinogen aufgrund des ungünstigen Anreicherungsverhaltens (zwei pH-Maxima) für derartige Bestimmungen schlechter geeignet.

Mit Schweinesubstrat und homologem Renin durchgeführte Untersuchungen über die Abhängigkeit der Angiotensinbildung von der NaCl-, NaBr-, KCl-, Na_2SO_4 - und Harnstoffkonzentration im

Inkubationsmedium ergaben den Hinweis, daß die Renin-Angiotensinogen-Reaktion von der Ionenstärke des Inkubationsmediums abhängig ist.

Die Ergebnisse, die sich bei Untersuchungen mit menschlichem Renin und homologem Substrat (Substrat bei Sättigung und im anfänglichen, linearen Bereich der Michaelis-Menten-Beziehung) ergaben, daß die Elektrolytabhängigkeit der Renin-Angiotensinogen-Reaktion wiederum von der Renin-Substrat-(Fremdprotein)-Konzentration abhängt.

Die bei den Renin-Substrat-Reaktionen entstandenen Angiotensine der fünf verschiedenen Spezies wurden papierchromatographisch, enzymchemisch und durch Untersuchungen am isolierten Aortenstreifen des Kaninchens auf ihre Spezifität hin geprüft. Es konnte gezeigt werden, daß sich bei der Anreicherung des Hunde- und Rinderangiotensinogens mit den angewandten drei Methoden (Fällung, Sephadex-Gel-Filtration und Disk-Elektrophorese) die in dem Ausgangsserum enthaltene converting-enzyme-Aktivität nicht vollständig abtrennen läßt.

Enzymkinetische Untersuchungen über die Abbaugeschwindigkeit der verschiedenen Angiotensine durch menschliche Erythrozytenangiotensinase im pH-Optimum zeigen für das Rattenangiotensin eine deutlich langsamere Abbaurate, als bei den Angiotensinen der anderen Spezies.

Unter Zugrundelegung der für hochangereichertes menschliches Renin in vitro gemessenen thermischen Halbwertszeit von etwa 70 Std., sind für die Bestimmung von Mikro-Reninmengen aus Gewebe Inkubationszeiten von höchsten 5 - 10 Std. angezeigt.

Literaturverzeichnis

- 1) ARAKAWA, K. und F.M. BUMPUS:
An improved synthesis of isoleucine⁵ angiotensin octapeptide.
J.Am.Chem.Soc. 83, 728 (1961)
- 2) BING, J., P.C. ESKILDSEN, P. FAARUP und O. FREDERIKSEN:
Location of renin in kidneys and extrarenal tissues.
Circulat.Res. 20, 21 II-3, Suppl. II (1967)
- 3) BING, J. und P. FAARUP:
A qualitative and quantitative study of renin in the
different layers of the rabbit uterus.
Acta Pathol.Microbiol.Scand. 67, 169 (1966)
- 4) BING, J. und P. FAARUP:
Location of renin (or a renin-like substance) in the
submaxillary glands of albino mice.
Acta Pathol.Microbiol.Scand. 64, 203 (1965)
- 5) BING, J. und J. KAZIMIERCZAK:
Renin content of different parts of the juxtaglomerular
apparatus. 4. Localisation of renin in the kidney.
Acta Pathol.Microbiol.Scand. 54, 80 (1962)
- 6) BINNION, P.F., J.O. DAVIS, T.C. BROWN und M.J. OLICHNEY:
Mechanisms regulating aldosterone secretion during sodium
depletion.
Amer.J.Physiol. 208, 655 (1965)
- 7) BIRON, P., E. KOIW, W. NOWACZYNSKI, J. BROUILLET und J. GENEST:
The effects of intravenous infusions of valine⁵-angiotensin II
and other pressor agents on urinary electrolytes and
corticosteroids, including aldosterone.
J.Clin.Invest. 40, 338 (1961)
- 8) BOUCHER, R., J. MENARD und J. GENEST:
A micromethod for measurement of renin in the plasma and
kidney of rats.
Canad.J.Physiol. 45, 881 (1967)
- 9) BOUCHER, R., R. VEYRAT, J. de CHAMPLAIN und J. GENEST:
New procedures for measurement of human plasma angiotensin
and renin activity levels.
Canad.Med.Ass.J. 90, 194 (1964)
- 10) BOYD, G.W., J. LONDON und W.S. PEART:
Radioimmunoassay for determining plasma-levels angiotensin II
in man.
Lancet 2, 1002 (1967)

- 11) BOYD, G.W. und W.S. PEART:
Production of present high-titre antibody against free
angiotensin II.
Lancet 2, 129 (1968)
- 12) BRAUN-MENENDEZ, E., J.C. FASCILOLO, L.F. LELOIR und J.M. MUNOZ:
The substance causing renal hypertension.
J.Physiol. 98, 283 (1940)
- 13) BROWN, J.J., D.L. DAVIES, A.F. LEVER und J.I.S. ROBERTSON:
Variations in plasma renin concentration in several
physiological and pathological states.
Canad.Med.Ass.J. 90, 201 (1964)
- 14) BROWN, J.J., D.L. DAVIES, A.F. LEVER, R.A. PARKER und
J.I.S. ROBERTSON:
The assay of renin in single glomeruli in the normal rabbit
and the appearance of the juxtaglomerular apparatus.
J.Physiol.(Lond.) 176, 418 (1965)
- 15) BROWN, J.J., D.L. DAVIES, A.F. LEVER, R.A. PARKER und
J.I.S. ROBERTSON:
The assay of renin in single glomeruli and the appearance
of the juxtaglomerular apparatus in the rabbit following
renal artery constriction.
Clin.Sci. 30, 223 (1966)
- 16) BROWN, J.J., D.L. DAVIES, A.F. LEVER, J.I.S. ROBERTSON und
M. TREE:
The estimation of renin in human plasma.
Biochem.J. 93, 594 (1964)
- 17) BUMPUS, F.M.:
Biochemical aspects of the renin-angiotensin-system.
Trans.NY Acad.Sci. 27, 445 (1965)
- 18) CATT, K.J., M.C. CAIN und J.P. COGHLAN:
Measurement of angiotensin II in blood.
Lancet 2, 1005 (1967)
- 19) COOK, W.F. und M.R. LEE:
The preparation of rabbit renin substrate for the assay
of minute amounts of renin.
Biochem.J. 96, 413 (1965)
- 20) COOK, W.F. und G.W. PICKERING:
The location of renin in the rabbit kidney.
J.Physiol. 149, 526 (1959)
- 21) COOK, W.F. und G.W. PICKERING:
The location of renin in the kidney.
Biochem.Pharmacol. 9, 165 (1962)

- 22) DAHLHEIM, H., I. HEROLD, P. WEBER und K. THURAU:
Präparative Anreicherung des natürlichen Reninsubstrates
und Verwendung für die Reninbestimmung im Mikromaßstab.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chemie 348, 1229 (1967)
- 23) DAHLHEIM, H., P. GRANGER und K. THURAU:
A sensitive method for determination of renin activity
in the single juxtaglomerular apparatus of the rat kidney.
Pflügers Arch. 321, 303 (1970)
- 24) DAHLHEIM, H., K. PETSCHAUER und K. THURAU:
Anreicherung und Charakterisierung der Erythrozyten-
angiotensinase.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 305, 105 (1969)
- 25) DAHLHEIM, H., J. ROSENTHAL, P. WEBER und H.P. WOLFF:
Purification of human renin substrate and characterization
of human renin by enzyme kinetic studies.
IVth Intern.Congr.Nephrol.,Stockholm, Juni 1969
- 26) DAHLHEIM, H., L. STRAUCH, P. WEBER und K. THURAU:
in Vorbereitung.
- 27) DAHLHEIM, H., P. WEBER, I. HEROLD, K. PETSCHAUER und K. THURAU:
Preparative methods to purify the renin substrate.
V Symp.Ges.Nephrol.,Lausanne, Sept. 1967
Progress in Nephrology - Springer-Verlag
- 28) DAHLHEIM, H., P. WEBER, I. HEROLD und K. THURAU:
Untersuchungen über präparative Anreicherungsmöglichkeiten
des Reninsubstrates (Angiotensinogen).
Pflügers Arch. 298, 131 (1967)
- 29) DAHLHEIM, H., P. WEBER, K. PETSCHAUER, und K. THURAU:
Das enzymatische Bildungs- und Abbauverhalten des Angiotensins
in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums.
VI Symp.Ges.Nephrol.,Wien, Sept. 1968
- 30) DAHLHEIM, H., P. WEBER und J. ROSENTHAL:
Reaktionskinetische Untersuchungen über die Angiotensin-
bildung mit menschlichem Renin und angereicherten
Angiotensinogenen fünf verschiedener Spezies.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 312, 88 (1969)
- 31) DAHLHEIM, H., P. WEBER und K. THURAU:
Anreicherung des Reninsubstrates im Schweineserum und
Anwendung in einer Mikro-Renin-Bestimmung.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 294, 31 (1967)
- 32) DAHLHEIM, H., P. WEBER und K. THURAU:
Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit der enzyma-
tischen Angiotensinbildung in vitro in Abhängigkeit von der
elektrolytischen Zusammensetzung des Inkubationsmediums.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 310, 137 (1969)

- 33) DAHLHEIM, H., P. WEBER, P. WALTER und J. ROSENTHAL:
Vergleichende reaktionskinetische Untersuchungen mit standardi-
siertem Renin an vier angereicherten tierischen Reninsubstraten.
Pflügers Arch. 317, 344 (1970)
- 34) DAHLHEIM, H.:
Private Mitteilungen.
- 35) DAVIS, J.O.:
Memoirs of the Society of Endocrinology:
Hormones and the kidney.
London and New York: Academic, 1963, p.325
- 36) DEOHAR, S.D.:
Immunologic production of antiangiotensin I.
Preparation of angiotensin-protein complex antigen.
J.Exper.Med. 111, 419 (1960)
- 37) DIETRICH, F.M.:
Immunogenicity of sythetic angiotensin II.
Internat.Arch.Allergy 30, 497 (1966)
- 38) DISTLER, A., H. LIEBAU und H.P. WOLFF:
Action of angiotensin on sympathetic nerve endings in
isolated blood vessels.
Nature 207, 764 (1965)
- 39) EDELMANN, R. und P.M. HARTROFT:
Localization of renin in juxtaglomerular cells of rabbit and
dog through use of the fluorescent antibody technique.
Circ.Res. 9, 1069 (1961)
- 40) FÜLGRAFF, G.:
Angiotensin.
Med.Welt 20, 17, 1001 (1969)
- 41) GAUER, O.H., J.P. HENRY und C. BEHN:
The regulation of extracellular fluid volume.
Ann.Rev.Physiol. 32, 547 (1970)
- 42) GENEST, J., J. de CHAMPLAIN, R. VEYRAT, R. BOUCHER,
G.Y. TREMBLAY, C.G. STRONG, E. KOIW und J. AURÉLE MARC:
Role of the renin-angiotensin system in various physio-
logical and pathological states. Hypertensin.
Amer. Heart Ass.Monograph 13, 97 (1965)
- 43) GENEST, J., G. SIMARD, J. ROSENTHAL und R. BOUCHER:
Norepinephrine and renin content in arterial tissue from
different vascular beds.
Canad.J.Physiol.Pharmacol. 47, 87 (1969)

- 44) GENEST, J., P. GRANGER, J. de CHAMPLAIN und R. BOUCHER:
Endocrine factors in congestive heart failure.
Amer.J.Cardiol. 22, 35 (1968)
- 45) GENEST, J., G.Y. TREMBLAY, R. BOUCHER, J. de CHAMPLAIN,
Q.M. ROJO-ORTEGA, R. LEFEBRE, P. ROY und P. CARTIER:
Diagnostic significance of humoral factors in renovascular
hypertension. In: Antihypertension therapy, ed.by F. Gross.
Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1966
- 46) GÖCKE, D.J., L.M. SHERWOOD, J. OPPENHOFF, J. GERTEN und
J.M. LARAGH:
Measurement of plasma angiotensin II and correlation with
renin activity.
J.Clin.Endocrinol. and Metabol. 28, 1675 (1968)
- 47) GOLDBLATT, H.:
The renal origin of hypertension.
Physiol.Rev. 27, 120 (1947)
- 48) GOLDBLATT, H., E. HAAS und H. LAMFROM:
Trans.Assoc.Am.Physicians 64, 122 (1951)
- 49) GOLDBLATT, H., H. LAMFROM und E. HAAS:
Physiological properties of renin and hypertension.
Amer.J.Physiol. 175, 75 (1953)
- 50) GOLDBLATT, H., J. LYNCH, R.F. HANZAL und W.W. SUMMerville:
Studies on experimental hypertension. I. The production
of persistent elevation of systolic blood pressure by
means of renal ischemia.
J.Exp.Med. 59, 347 (1934)
- 51) GRANGER, P., H. DAHLHEIM und K. THURAU:
Renin-, Angiotensinase- und Converting Enzym-Bestimmungen
an einzelnen mikrodissezierten juxtaglomerulären Apparaten
und Teilen des Nephrons.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 312, 87 (1969)
- 52) GOODFRIEND, T.L., L. LEVINE und G.D. FASMAN:
Antibodies to bradykinin and angiotensin: use of carbo-
diimides in immunology.
Science 144, 1344 (1964)
- 53) GOORMAGHTIGH, N.:
Facts in favour of an endocrine function of the renal
arterioles.
J.Path.Bact. 57, 392 (1945)
- 54) GOULD, A.B., L.T. SKEGGS und J.R. KAHN:
The presence of renin activity in blood vessel walls.
J.Exp.Med. 119, 389 (1964)

- 55) GOULD, A.B., L.T. SKEGGS und J.R. KAHN:
Measurement of renin and substrate concentrations in human serum.
Lab.Invest. 15, 1802 (1966)
- 56) GREEN, A.A. und F.M. BUMPUS:
The purification of hog renin substrate.
J.Biol.Chem. 210, 281 (1954)
- 57) GROSS, F.:
Experimentelle Grundlagen zur Pathophysiologie des Renin-Angiotensin-Systems.
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin, 74, 27 (1968)
- 58) GROSS, F., H. BRUNNER und M. ZIEGLER:
Renin-angiotensin-system, aldosterone and sodium balance.
Recent Progr.Hormone Res. 21, 119 (1965)
- 59) GROSS, F. und F. SULSER:
Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Pathol.Pharmak. 229, 374 (1956)
- 60) GROSS, F., G. SCHAECHTELIN, M. ZIEGLER und M. BERGER:
A renin-like substance in the placenta and uterus of the rabbit.
Lancet, I, 914 (1964)
- 61) HAAS, E. und H. GOLDBLATT:
Kinetic constants of human renin and human angiotensinogen reaction.
Circulation Res. 20, 45 (1967)
- 62) HAAS, E., H. GOLDBLATT und E.C. GIPSON:
A study of enzymatic and antigenic properties of renin.
The Journal of Immunology, 91 (2), 170 (1963)
- 63) HAAS, E., H. GOLDBLATT und E.C. GIPSON:
Extraction, purification and acetylation of human renin and the production of antirenin to human renin.
Arch.Biochem. 110, 534 (1965)
- 64) HABER, E.:
Recent developments in pathophysiologic studies of the renin-angiotensin-system.
The New England Journ.of Medicine, 280 (3), 148 (1969).
- 65) HABER, E., T. KOERNER und L.B. PAGE:
Immunoassay for angiotensin I and its application to determination of renin activity.
Circulation 38 (Suppl 6), 6 (1968)

- 66) HABER, E., L.B. PAGE und G.A. JACOBY:
Synthesis of antigenic branchchain copolymers of angiotensin and poly-L-lysine.
Biochemistry 4, 693 (1965)
- 67) HARTROFT, P.M., L.E. SUTHERLAND und W.S. HARTROFT:
Juxtaglomerular cells as the source of renin. Further studies with the fluorescent antibody technique and the effect of passive transfer of antirenin.
Canad.Med.Assoc.J. 90, 163 (1963)
- 68) HELMER, O.M.:
Differentiation between two forms of angiotonin by means of spirally cut strips of rabbit aorta.
Am.J.Physiol. 188, 571 (1957)
- 69) HELMER, O.M. und W.E. JUDSON:
Quantitative determination of renin in the plasma of patients with arterial hypertension.
Circulation 27, 1050 (1963)
- 70) HODGE, R.L., R.D. LOWE und J.R. VANE:
The effects of alteration of blood-volume on the concentration of circulating angiotensin in anaesthetized dogs.
J.Physiol. (Lond.) 185, 613 (1966)
- 71) HOLLEMANS, H.J.G., J. VANDERMEER und J.L. TOUBER:
Radioimmunoassay of angiotensin; its use in measurement of renin activity in plasma.
In Protein and Polypeptide Hormones, Part II: Proceedings of an International Symposium.
Edited by M. Margoulies. Liège, Belgium:
Excerpta Medica Foundation, 1968; pp. 370-372 (1968)
- 72) HORSTER, M., W. NAGEL, J. SCHNERMANN und K. THURAU:
Zur Frage einer direkten Angiotensinwirkung auf die Natriumresorption im proximalen Tubulus und in der Henlèschen Schleife der Rattenniere.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 292, 118 (1966)
- 73) INAGAMI, T. und J.M. STURTEVANT:
Nonspecific Catalysis by α -Chymotrypsin and Trypsin.
J.biol.Chemistry 235, 1019 (1960)
- 74) JOHNSON, C.A. und G.E. WAKERLIN:
Antiserum for renin.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 44, 277 (1940)
- 75) KEUTEL, H.J., H.C. OUTZEN und R.G. WEAVER:
Invest.Urol. 5, 107 (1967)

- 76) LARAGH, J.H., M. ANGERS, W.G. KELLY und S. LIEBERMAN:
Hypotensive agents and pressor substances.
J.Am.Med.Assoc. 174, 234 (1960)
- 77) LARAGH, J.H., J.E. SEALY und S.C. SOMMERS:
Patterns of adrenal secretion and urinary excretion of
aldosterone and plasma renin activity in normal and hyper-
tensive subjects.
Circulat.Res. 19, Suppl. I, 158 (1966)
- 78) LEE, M.R., W.F. COOK und J.K. MCKENZIE:
A sensitive method for assay of plasma renin activity.
Circulat.Res. 19, 260 (1966)
- 79) LENTZ, K.E., L.T. SKEGGS, K.R. WOODS, J.R. KAHN und N.P. SHUMWAY:
The amino acid composition of hypertension II and its bio-
chemical relationship to hypertension I.
J.Exper.Med. 104, 183 (1956)
- 80) LEVER, A.F. und W.S. PEART:
Renin- and angiotensin-like activity in renal lymph.
J.Physiol.(Lond.) 160, 548 (1962)
- 81) LEVER, A.F., J.I.S. ROBERTSON und M. TREE:
The estimation of renin in plasma by an enzyme kinetic
technique.
Biochemical J. 91, 346 (1964)
- 82) LEYSSAC, P.P.:
The in vitro effect of angiotensin on the proximal tubular
reabsorption of salt in rat kidney.
Acta physiol.scand. 62, 436 (1964)
- 83) LEYSSAC, P.P.:
The in vitro effect of angiotensin and noradrenalin on the
proximal tubular reabsorption of salt in mammalian kidney.
Acta physiol.scand. 64, 167 (1965)
- 84) MONTAGUE, D., B. RINIKER und F. GROSS:
Kinetics of the renin-substrate reaction employing a
synthetic substrate.
Amer.J.Physiol. 210, 595 (1966)
- 85) NG, K.K.F. und J.R. VANE:
Conversion of angiotensin I to angiotensin II.
Nature 216, 762 (1967)
- 86) NG, K.K.F. und J.R. VANE:
Fate of angiotensin I in circulation.
Nature 218, 144 (1968)

- 87) OCHWADT, B., H.D. LOWITZ und K.O. STUMPE:
Influence of angiotensin on tubular function studied by
micropuncture techniques in the rat.
IV Intern.Congr.Nephrol., Stockholm 1969, Abstracts I, 198
- 88) ORNSTEIN, L.:
Disc Electrophoresis-I, background and theory.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 121, 321 (1964)
- 89) ORNSTEIN, L. und B.J. DAVIS:
Disc-Electrophoresis.
Reprinted by Distillation Products Industries, NY (1962)
- 90) PAGE, I.H. und F.M. BUMPUS:
Angiotensin.
Physiol.Rev. 41 (2), 331 (1961)
- 91) PAGE, L.B., E. HABER, A.Y. KIMURA und A. PURNODE:
Studies with radioimmunoassay for angiotensin II and its
application to measurement of renin activity.
J.clin.Endocrinol. and Metab. (in press)
- 92) PAGE, I.H. und O.M. HELMER:
A crystalline pressor substance, angiotonin, resulting
from the reaction between renin and renin activator.
Proc.Soc.Clin.Invest. 12, 17 (1939)
- 93) PAGE, I.H. und O.M. HELMER:
A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting
from the reaction between renin and renin activator.
J.Exper.Med. 71, 29 (1940)
- 94) PEART, W.S.:
Renin and hypertension.
Ergebn.Physiol. 50, 409 (1959)
- 95) PETSCHAUER, K.:
Dissertation.
Universität München 1972
- 96) PETSCHAUER, K., H. DAHLHEIM und K. THURAU:
Anreicherung und Charakterisierung der Erythrozytenangio-
tensinase.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 300, R 38 (1968)
- 97) PICKENS, P.T., F.M. BUMPUS, A.M. LLOYD, R.R. SMEBY und I.H. PAGE:
Measurement of renin activity in human plasma.
Circul.Res. 17, 438 (1965)
- 98) PLENTL, A.A., I.H. PAGE und W.W. DAVIS:
The nature of renin activator.
J.Biol.Chem. 147, 143 (1943)

- 99) POULSEN, K.:
Measurement of renin in human plasma.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 21, 49 (1968)
- 100) REGOLI, D., H. BRUNNER, G. PETERS und F. GROSS:
Changes in renin content in kidneys of renal hypertensive rats.
Proc.Soc.exp.Biol.(NY) 109, 142 (1962)
- 101) REGOLI, D. und J.R. VANE:
The continuous estimation of angiotensin formed in the circulation of the dog.
J.Physiol. 183, 513 (1966)
- 102) REINHARZ, A. und M. ROTH:
Studies on renin with synthetic substrates.
Europ.J.Biochem. 7, 334 (1969)
- 103) RITTEL, W.B., B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER und R. SCHWYZER:
Synthese eines hochwirksamen Hypertensin-II-amids.
Helv.Chim.Acta 40, 614 (1957)
- 104) ROSENTHAL, J., R. BOUCHER, J.M. ROJO-ORTEGA und J. GENEST:
Renin activity in the aortic tissue of rats.
Canad.J.Physiol.Pharmacol. 47, 53 (1969)
- 105) ROSENTHAL, J., P. WEBER und H. DAHLHEIM:
Comparative enzyme-kinetic studies of human renin with purified renin substrates from different species.
Third annual meeting of the Europ.Soc. for Clin.Invest. in Sheveningen, April 1969
- 106) ROSENTHAL, J., H.P. WOLFF, P. WEBER und H. DAHLHEIM:
Enzyme kinetic studies on human renin and its purified homologue substrate..
Am.J.Physiol.(in press)(1972)
- 107) RYAN, J.W.:
Reninlike enzyme in the adrenal gland.
Science 158, 1589 (1967)
- 108) SCHWARZ, H., F.M. BUMPUS und J.H. PAGE:
Synthesis of a biologically active octapeptide similar to natural isoleucine angiotonin octapeptide.
J.Am.Chem.Soc. 79, 5697 (1957)
- 109) SKEGGS, L.T., J.R. KAHN und N.P. SHUMWAY:
The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme.
J.Exp.Med. 103, 295 (1956)

- 110) SKEGGS, L.T., J.R. KAHN, K.E. LENTZ und N.P. SHUMWAY:
The preparation, purification and amino acid sequence of
a polypeptide renin substrate.
J.Exp.Med. 106, 439 (1957)
- 111) SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, A.B. GOULD, H. HOCHSTRASSER und
J.R. KAHN:
Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system.
Fed.Proc. 26, 42 (1967)
- 112) SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, H. HOCHSTRASSER und J.R. KAHN:
The chemistry of renin substrate.
Canad.med.Ass.J. 90, 185 (1964)
- 113) SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, J.R. KAHN und H. HOCHSTRASSER:
Kinetics of the reaction of renin with nine synthetic
peptide substrates.
J.Exp.Med. 128, 13 (1968)
- 114) SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, J.R. KAHN und N.P. SHUMWAY:
The synthesis of a tetradecapeptide renin substrate.
J.Exp.Med. 108, 283 (1958)
- 115) SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, N.P. SHUMWAY und K.R. WOODS:
The amino acid sequence of hypertensin II.
J.Exp.Med. 104, 193 (1956)
- 116) SKINNER, S.L.:
Improved assay methods for renin "concentration" and
"activity" in human plasma.
Circulat.Res. 20, 391 (1967)
- 117) SKINNER, S.L., J.W. McCUBBING und I.H. PAGE:
Control of renin secretion.
Circulat.Res. 15, 64 (1964)
- 118) STAKEMAN, G.:
A renin-like pressor substance found in the placenta of
the cat.
Acta Pathol.Microbiol.Scand. 50, 350 (1960)
- 119) STRAUCH, L.:
Eine automatische Apparatur für die präparative Disk-
Elektrophorese im Polyacrylamidgel.
Wissenschaftl.-techn.Inf. (WTW) 10, 23 (1968)
- 120) SYMONDS, E.M., M.A. STANLEY und S.L. SKINNER:
Production of renin by in vitro cultures of human chorion
and uterine muscle.
Nature 217, (Nr. 5134), 1152 (1968)

- 121) THURAU, K.:
Die intrarenale Rolle des Renin-Angiotensin-Systems für die
Regulation des Glomerulumfiltrates und der Natriumausscheidung.
Aktuelle Probleme der Nephrologie.
IV.Symp.d.Ges.f.Nephrol., Springer-Verlag (1966)
- 122) THURAU, K., H. DAHLHEIM und P. GRANGER:
On the local formation of angiotensin at the site of the
juxtaglomerular apparatus.
Contribution to the Intern.Congr.Nephrol.,Stockholm 1969
- 123) THURAU, K., H. DAHLHEIM, A. GRÜNER, J. MASON und P. GRANGER:
The dependence of renin activity in the single juxtaglomerular
apparatus of the rat nephron upon NaCl in the fluid
of the macula densa segment.
XXV.Intern.Congr.of Physiol.Scienc., Munich 1971
- 124) THURAU, K. und J. SCHNERMANN:
Die Natriumkonzentration an den Macula-Densa-Zellen als
regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat.
Klin.Wochschr. 43, 410 (1965)
- 125) THURAU, K., J. SCHNERMANN, W. NAGEL, M. HORSTER und M. WAHL:
Composition of tubular fluid in the macula densa segment
as a factor regulating the function of the juxtaglomerular
apparatus.
Supp.II to Circ.Res. 20, 21, 11-79 (1967)
- 126) TIGERSTEDT, R. und P.G. BERGMANN:
Niere und Kreislauf.
SkandArch.Physiol. 8. 223 (1898)
- 127) TOBIAN, L.:
Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular cells
and hypertension.
Physiol.Rev. 40, 280 (1960)
- 128) VANDER, A.J.:
Inhibition of distal tubular sodium reabsorption by
angiotensin II.
Am.J.Physiol. 205, 133 (1963)
- 129) VANDER, A.J.:
Control of renin release.
Physiol.Rev. 47, 359 (1967)
- 130) VANDER, A.J. und J.R. LUCIANO:
Effects of mercurial diuresis and acute sodium depletion on
renin release in dog.
Am.J.Physiol. 212, 651 (1967)

- 131) WALTER, P.:
Wirkung von Adeninnucleotiden und Dipyridamol an Streifen-
präparaten von Blutgefäßen.
Dissertation, Med.Fak.d.Univ. München (1968)
- 132) WARREN, B. und M. DOLINSKI:
Studies on the human renin-anti-renin-system.
Immunology 16, 167 (1969)
- 133) WARREN, B., A.G. JOHNSON und S.W. HOOBLER:
Characterization of the renin-antirenin system.
J.Exp.Med. 123, 1109 (1966)
- 134) WERLE, E.:
Private Mitteilungen.
- 135) WEBER, P., H. DAHLHEIM, I. HEROLD und K. THURAU:
Weitere Untersuchungen über die Charakterisierung und
Nachweismethodik des natürlichen Reninsubstrates.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 297, R II (1967)
- 136) WISENBAUGH, E.P., N.E. WILLS und R.W. HILL:
Paper chromatographic identification of angiotensins.
Am.J.Physiol. 207 (4), 759 (1964)

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer.nat. H. Dahlheim danke ich für die Überlassung des Themas und die anregenden Diskussionen sowie hilfreiche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Kurt Kramer und Herrn Prof. Dr. Klaus Thureau danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten im Physiologischen Institut und für ihr Interesse an der Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 28. Februar 1944 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Michael Weber und dessen Ehefrau Edith, geb. Alzner, in Bistritz/Siebenbürgen geboren.

Besuch der Volksschulen in Linau/Schleswig-Holstein, Ratingen bei Düsseldorf und München (1950-1954). Ab 1954 Besuch des Humanistischen Gymnasiums in Pasing, dann des Neuen Realgymnasiums München und des Realgymnasiums in Icking, wo ich 1964 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich an der Universität München das Medizinstudium, das ich während des Sommersemesters 1970 mit dem Staatsexamen abschloß.

Ab 1966 arbeitete ich als Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft im Physiologischen Institut der Universität München. Als Medizinalassistent war ich im Kreiskrankenhaus München-Pasing tätig, wo ich neben den Pflichtzeiten für Innere Medizin und Chirurgie vier Monate auf der Anästhesieabteilung verbrachte. Die Approbation als Arzt erhielt ich im August 1971.

Zur Zeit bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle in der II. Med. Klinik der Universität München angestellt.

Ich bin verheiratet und habe zwei Kinder.

